



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

Instituto de la Grasa

**BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES
DESDE MATRICES LIPOFÍLICAS E
HIDROFÍLICAS. COMPETITIVIDADES Y
SINERGIAS**

Elisabet Fernández García

Sevilla a 23 de Julio de 2010



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

Instituto de la Grasa

**BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES
DESDE MATRICES LIPOFÍLICAS E
HIDROFÍLICAS. COMPETITIVIDADES Y
SINERGIAS**

Memoria que presenta
Lda. D^a. Elisabet Fernández García
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas
dentro del Programa de Doctorado
Estudio Avanzados en Alimentos.
Departamento de Ingeniería Química
Facultad de Química
Universidad de Sevilla

Sevilla a 23 de Julio de 2010



La Tesis titulada “BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES DESDE MATRICES LIPOFÍLICAS E HIDROFÍLICAS. COMPETITIVIDADES Y SINERGIAS”, presentada por la Licenciada en CIENCIAS QUÍMICAS **D^a ELISABET FERNÁNDEZ GARCÍA** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología de Alimentos, del Instituto de la Grasa (CSIC), bajo la dirección de los Doctores **D. Antonio Pérez Gálvez y D. Juan Garrido Fernández**. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

En Sevilla a 23 Julio de 2010

Los directores y el tutor

Fdo. Antonio Pérez Gálvez

Fdo. Juan Garrido Fernández

Fdo. Isabel Mª Vicario Romero

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
CAROTENOIDES: ESTRUCTURA	9
CAROTENOIDES: PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA	11
CONTENIDO CAROTENOIDE EN ALIMENTOS Y VALORES DE INGESTA MEDIA	17
CAROTENOIDES COMO COLORANTES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	20
FUNCIONES Y ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS CAROTENOIDES.....	23
<i>Funciones biológicas</i>	<i>23</i>
<i>Acciones biológicas</i>	<i>25</i>
CAROTENOIDES EN EL CONTEXTO DE LA DIETA FUNCIONAL	34
BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES.....	37
<i>Digestibilidad: solubilización y micelarización.....</i>	<i>39</i>
<i>Asimilación.....</i>	<i>43</i>
BIOACCESIBILIDAD DE CAROTENOIDES DESDE MATRICES HIDROFÍLICAS	45
MODELOS DE DIGESTIÓN IN VITRO.....	46
MODELOS DE ASIMILACIÓN IN VITRO	51
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
MATERIAS PRIMAS	63
<i>Extractos vegetales concentrados en carotenoides.....</i>	<i>63</i>
<i>Emulgentes.....</i>	<i>63</i>
<i>Mantequillas y margarinas.....</i>	<i>64</i>
REACTIVOS Y DISOLVENTES	66
DISEÑO EXPERIMENTAL (1)	67
<i>Definición y cálculo de la eficiencia de la micelarización (EM).....</i>	<i>67</i>
<i>Factores implicados en la micelarización de carotenoides en matrices lipofílicas</i>	<i>68</i>
<i>Formulación de la matriz hidrofílica para maximizar la EM de carotenoides.....</i>	<i>69</i>
<i>Fase de barrido experimental: detección de factores críticos.....</i>	<i>70</i>
<i>Optimización de la mezcla de factores críticos</i>	<i>70</i>
DISEÑO EXPERIMENTAL (2)	72
MÉTODOS	73
<i>Determinación de la actividad de triacilglicerol acil hidrolasa</i>	<i>73</i>
<i>Determinación de la concentración de proteínas.....</i>	<i>73</i>
<i>Determinación de la actividad de sacarasa en vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC).....</i>	<i>74</i>
<i>Aislamiento de lipoproteínas de alta densidad del suero de oveja</i>	<i>74</i>
<i>Determinación de la concentración carotenoide en los extractos vegetales concentrados y materias grasas para untar</i>	<i>75</i>
<i>Elaboración de emulsiones</i>	<i>77</i>

<i>Determinación de la concentración carotenoide en emulsiones</i>	<i>77</i>
<i>Procedimiento de separación y purificación aplicado a extractos oleosos concentrados de licopeno, luteína libre y β-caroteno</i>	<i>77</i>
<i>Preparación de suspensiones Tween carotenoide y de complejos de inclusión β-ciclodextrina:carotenoide</i>	<i>78</i>
<i>Determinación de la concentración carotenoide en suspensiones Tween carotenoide y complejos de inclusión β-ciclodextrina:carotenoide</i>	<i>78</i>
<i>Proceso de digestión in vitro</i>	<i>79</i>
<i>Separación de la fracción micelar</i>	<i>79</i>
<i>Extracción y cuantificación de carotenoides en la fracción micelar</i>	<i>80</i>
<i>Obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC)</i>	<i>83</i>
<i>Proceso de asimilación in vitro e inhibición del transporte de carotenoides mediante lipoproteínas AP1</i>	<i>84</i>
<i>Extracción y cuantificación de carotenoides asimilados por VMBC e inhibidos por apolipoproteínas A1</i>	<i>85</i>
<i>Espectrometría de masas</i>	<i>85</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
FACTORES IMPLICADOS EN LA MICELARIZACIÓN DE CAROTENOIDES EN MATRICES LIPOFÍLICAS	92
EFICIENCIA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SOBRE ÉSTERES DE LUTEÍNA Y SU INCORPORACIÓN MICELAR	113
ESTIMACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE β-CAROTENO DESDE MATERIAS GRASAS PARA UNTAR. APLICACIÓN DEL MODELO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	119
<i>Fitoesteroles</i>	<i>123</i>
<i>Fibra</i>	<i>123</i>
<i>Grasa</i>	<i>124</i>
ENRIQUECIMIENTO DE LAS MATRICES CON β-CAROTENO Y EFECTO EN LA DIGESTIBILIDAD	125
SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE UNA EMULSIÓN O/W QUE MAXIMICE LA DIGESTIBILIDAD DE CAROTENOIDES	128
<i>Fase de barrido experimental: detección de factores críticos</i>	<i>129</i>
<i>Optimización de la mezcla de factores críticos</i>	<i>136</i>
EFICIENCIA DE LA ASIMILACIÓN DE CAROTENOIDES SUMINISTRADOS COMO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON β-CICLODEXTRINA EN UN MODELO <i>IN VITRO</i>. EFECTO DE INHIBIDORES LIPOPROTEICOS	143
CONCLUSIONES	165
AGRADECIMIENTOS	169
BIBLIOGRAFÍA	173

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los nuevos hábitos alimenticios, las recomendaciones dietéticas procedentes de los organismos públicos de salud y la presencia de compuestos bioactivos en los alimentos, todo ello con el objetivo de prolongar y mejorar nuestra vida saludable, han promovido la aparición de nuevos y considerables retos para la ciencia y la industria alimentaria. Aunque un alimento natural se considera un alimento funcional, es habitual aislar los compuestos bioactivos de la fuente apropiada, incrementando con ello su pureza y concentración en un extracto, y adicionarlos a la matriz alimentaria adecuada en la que llegarán al consumidor. Esta sencilla secuencia de procesamiento requiere la aplicación de una acción integrada en la que se consideran diversos aspectos como la identificación del compuesto bioactivo, su evaluación toxicológica, la tecnología de extracción y separación, estimación de su estabilidad y bioaccesibilidad, que una vez evaluados y conjuntados originan el producto.

Sin embargo, no todos los aspectos anteriormente reseñados reciben la misma atención en el proceso de diseño de alimentos funcionales. Son aspectos esenciales la evaluación toxicológica, para asegurar la ausencia de riesgos para la salud del nuevo producto, y la tecnología a aplicar, para optimizar los recursos y minimizar el impacto físico-químico sobre el compuesto/alimento. La bioaccesibilidad no ha sido una meta prioritaria en el diseño de alimentos funcionales por dos causas. En primer lugar, y aunque existían modelos de experimentación para obtener datos del proceso global de absorción de un nutriente (bioaccesibilidad), estos modelos no permitían distinguir la eficiencia de la digestibilidad y de la asimilación, etapas que componen el proceso global de bioaccesibilidad. En segundo lugar, no existía un consenso en el ámbito de la legislación europea sobre los alimentos funcionales que valoraran la importancia de este parámetro. La primera causa, en realidad una carencia, no ha impedido que se disponga de información relevante sobre la bioaccesibilidad de nutrientes esenciales y compuestos bioactivos, que sí la hay, sino que toda la información no se pueda aplicar de forma directa en el diseño de alimentos y formulaciones ya que el criterio de control en ese caso es la eficiencia de la digestibilidad parámetro en el que influye directamente la composición de la matriz alimentaria y las sinergias y antagonismos que se establezcan entre

los distintos componentes, originando una materia digerida potencialmente asimilable (segunda etapa del proceso de bioaccesibilidad).

En el caso concreto de los carotenoides se reproduce esta situación. Estos pigmentos constituyen un grupo de compuestos bioactivos que han atraído el interés de la industria debido al beneficio económico e impacto en la salud humana que su incorporación en alimentos funcionales puede producir. Los carotenoides presentan diversas funciones y acciones biológicas, como la de mostrar actividad de provitamina A, capacidad antioxidante frente a especies radicalarias y potenciación del sistema inmune. La bioaccesibilidad de estos compuestos lipofílicos de los alimentos naturales que los contienen (principalmente frutas y verduras) es generalmente poco eficiente y está condicionada por diversos factores entre los que destacan el grado de procesado del alimento y la composición de la matriz. Existen evidencias respecto a los efectos positivos que la homogeneización y el tratamiento térmico tienen en la bioaccesibilidad de estos compuestos, mientras que la presencia de fibra la disminuye. Un factor clave es la presencia de grasa de la que una mínima cantidad es necesaria para posibilitar la asimilación de carotenoides.

La información sobre la bioaccesibilidad de carotenoides desde alimentos naturales o procesados se ha obtenido por la aplicación de estudios de absorción post-prandiales y de suplementación. Esta aproximación, si bien ha resultado muy valiosa, no permite realizar análisis en detalle del efecto de la composición de la matriz alimentaria y otros factores implicados en la absorción de carotenoides, en cada una de las etapas en las que se divide el proceso de bioaccesibilidad de estos compuestos lipofílicos (digestibilidad y asimilación). Pero además de proporcionar una información no exhaustiva, los procedimientos son caros y, al utilizar modelos de experimentación animal o humano, se requiere obligatoriamente el cumplimiento de una serie de normas éticas y de bioseguridad. En los últimos años se han desarrollado y puesto a punto procesos experimentales que reproducen las condiciones fisiológicas y eventos que tienen lugar durante la digestión de alimentos en el tracto gastrointestinal humano. Los modelos de digestión *in vitro* constituyen un método analítico con el que se puede establecer la significación y alcance de diversos factores en la eficiencia de la

digestibilidad de compuestos bioactivos como los carotenoides y analizar en detalle la influencia de la composición de la matriz alimentaria en el proceso digestivo.

En el diseño de alimentos o formulaciones en los que se declara el beneficio saludable derivado de su consumo al contener uno o varios compuestos bioactivos, la estimación de la digestibilidad resulta clave. Para los carotenoides se podría considerar que su incorporación en formulaciones de mayor contenido graso como los extractos oleosos, es la más adecuada para optimizar la digestibilidad. Nada más lejos de la realidad. La transformación de un alimento esencialmente graso en materia asimilable por nuestro epitelio intestinal implica a una serie de procesos de dispersión y emulsión del contenido lipídico que no logran optimizar la cantidad carotenoide que es asimilable. Son las formulaciones en las que el contenido lipídico está finamente disperso en una matriz hidrofílica las que potencialmente pueden aumentar la eficiencia de la digestibilidad de carotenoides introduciendo entonces nuevas variables (la composición cualitativa y cuantitativa de los emulgentes) en el diseño de la formulación. Los modelos de digestión *in vitro* constituyen entonces el soporte analítico con el que estimar la digestibilidad de compuestos bioactivos (los carotenoides) y utilizar esta respuesta como criterio de discriminación en el diseño de emulsiones seleccionando aquellos ingredientes que la optimizan y descartando a los que la minimizan.

El proceso de absorción de carotenoides culmina con la etapa de asimilación, que implica un contacto entre el material asimilable integrado en las micelas y los enterocitos del epitelio intestinal. El conocimiento de los eventos que tienen lugar en esta etapa se ha ampliado sustancialmente en los últimos años, demostrando la existencia de mecanismos de absorción diferentes a los considerados inicialmente. Se suponía que dicha asimilación ocurría mediante un mecanismo de difusión pasiva, gobernado por el gradiente de concentración y modulado por el coeficiente de permeabilidad de cada compuesto. Sin embargo, el desarrollo de modelos de absorción *in vitro*, que utilizan vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC), o líneas celulares como la Caco-2, han permitido recomponer sustancialmente la teoría sobre el mecanismo de absorción de colesterol, carotenoides y otros compuestos lipídicos, observando características de absorción que sólo se explican mediante un mecanismo de difusión facilitada. Los modelos de absorción *in vitro* constituyen una

herramienta analítica con la que estimar la asimilación de compuestos bioactivos (los carotenoides) y determinar el perfil biocinético de lípidos en general, y de carotenoides en particular. El estudio de asimilación *in vitro* viene a completar el diseño de alimentos en los que el término bioaccesibilidad no sólo es un atributo de calidad, sino también un parámetro necesario que forma parte del concepto de alimento funcional.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Carotenoides: estructura

Los pigmentos vegetales se pueden agrupar en cinco grupos: tetrapirroles, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, y compuestos N-heterocíclicos. De estos grupos destaca el de carotenoides debido a su amplia presencia y distribución, diversidad estructural y por las funciones y acciones biológicas que desempeñan. Estructuralmente, este grupo de pigmentos naturales se consideran derivados isoprenoides, ya que se generan mediante la ruta anabólica que utiliza como unidad básica a isopentenil pirofosfato (Bach, 1995). El sucesivo ensamblaje de esta unidad da lugar a geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranil-geranil pirofosfato. La unión de dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato para dar lugar a fitoeno, en un proceso que consta de dos etapas, constituye el primer paso específico en la biosíntesis de carotenoides (Cunningham y Gantt, 1998). Este esqueleto estructural básico de 40 átomos de carbono (Figura 1) puede experimentar varias modificaciones estructurales, siguiendo diferentes rutas biosintéticas que introducen nuevas insaturaciones, ciclan uno o los dos extremos de la cadena, incorporan grupos funcionales oxigenados (hidroxilo, epóxido, ceto) e incluso producen reorganizaciones del grupo cíclico del extremo de la cadena, modificaciones estructurales que dan lugar a la amplia variedad de compuestos carotenoides descritos en la Naturaleza (Figuras 2 y 3).

En la estructura carotenoide se distinguen dos zonas bien diferenciadas. La cadena polienoica es la zona más representativa e importante de su estructura. Contiene un total de 22 átomos de carbono con 9 insaturaciones y cuatro grupos metilos laterales. El sistema de dobles y simples enlaces alternados que forma la parte central de la molécula está conjugado y los electrones situados en orbitales enlazantes tipo π , están deslocalizados a lo largo de la cadena. Esta disposición convierte a los pigmentos carotenoides en un grupo de componentes peculiares, dando lugar a sus propiedades y comportamiento físico-químico (Britton, 1995). Los grupos colocados en los extremos de la cadena polienoica constituyen otra zona de la molécula.

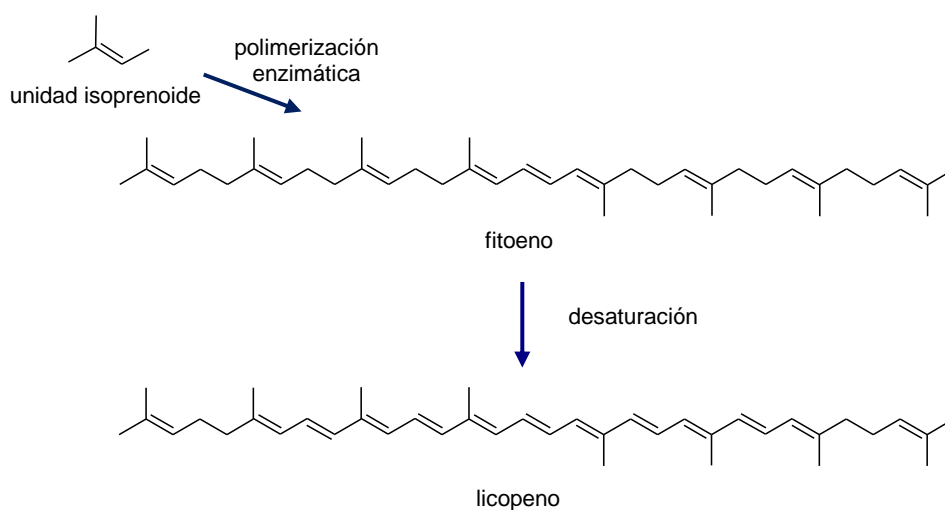


Figura 1.- Generación del esqueleto estructural básico, fitoeno, mediante la polimerización enzimática de la unidad isoprenoide, y su posterior conversión a licopeno por la introducción de insaturaciones.

Existen 7 grupos diferentes, y para su designación se utiliza una letra del alfabeto griego que aparece como prefijo a la palabra raíz *caroteno* (Figura 2). Generalmente, estos grupos incluyen grupos funcionales oxigenados cuya presencia distingue a las xantofilas de los carotenos (hidrocarburos exclusivamente). También es posible encontrar carotenoides con un número superior a 40 átomos de carbono (*homo*-carotenoides) o con un número inferior (*apo*-carotenoides si se han eliminado de los extremos, o *nor*-carotenoides si se han eliminado de la cadena). Todas estas particularidades y posibles combinaciones estructurales son el origen de la afirmación con la que comienza el siguiente apartado.

Carotenoides: presencia y distribución en la Naturaleza

De todos los pigmentos naturales, los carotenoides son los más ampliamente distribuidos y por el conjunto de funciones y acciones que realizan, los más importantes. Este grupo de compuestos, hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas), son esenciales en la fotosíntesis oxigénica y también están implicados en la prevención o protección contra enfermedades coronarias y cáncer (Ames, 1983; Malone, 1991; Britton, 1995). Estas funciones no resultan tan obvias como sus colores, por los cuales los carotenoides son tan llamativos. El rango de colores de estos pigmentos va desde el rojo hasta el amarillo, y cuando se acomplejan con proteínas producen coloraciones verdes y azules. De esta forma una gran variedad de organismos debe su color principalmente a los carotenoides. Se pueden encontrar en todos los filos tanto del reino vegetal como animal aunque son únicamente sintetizados *de novo* en las plantas superiores y por organismos procariotas. La presencia de carotenoides en los animales se debe exclusivamente a su incorporación por la dieta, ya que no pueden sintetizarlos *de novo*, hecho de especial trascendencia si se tiene en cuenta que algunos carotenoides muestran actividad de provitamina A (Pfander, 1992).

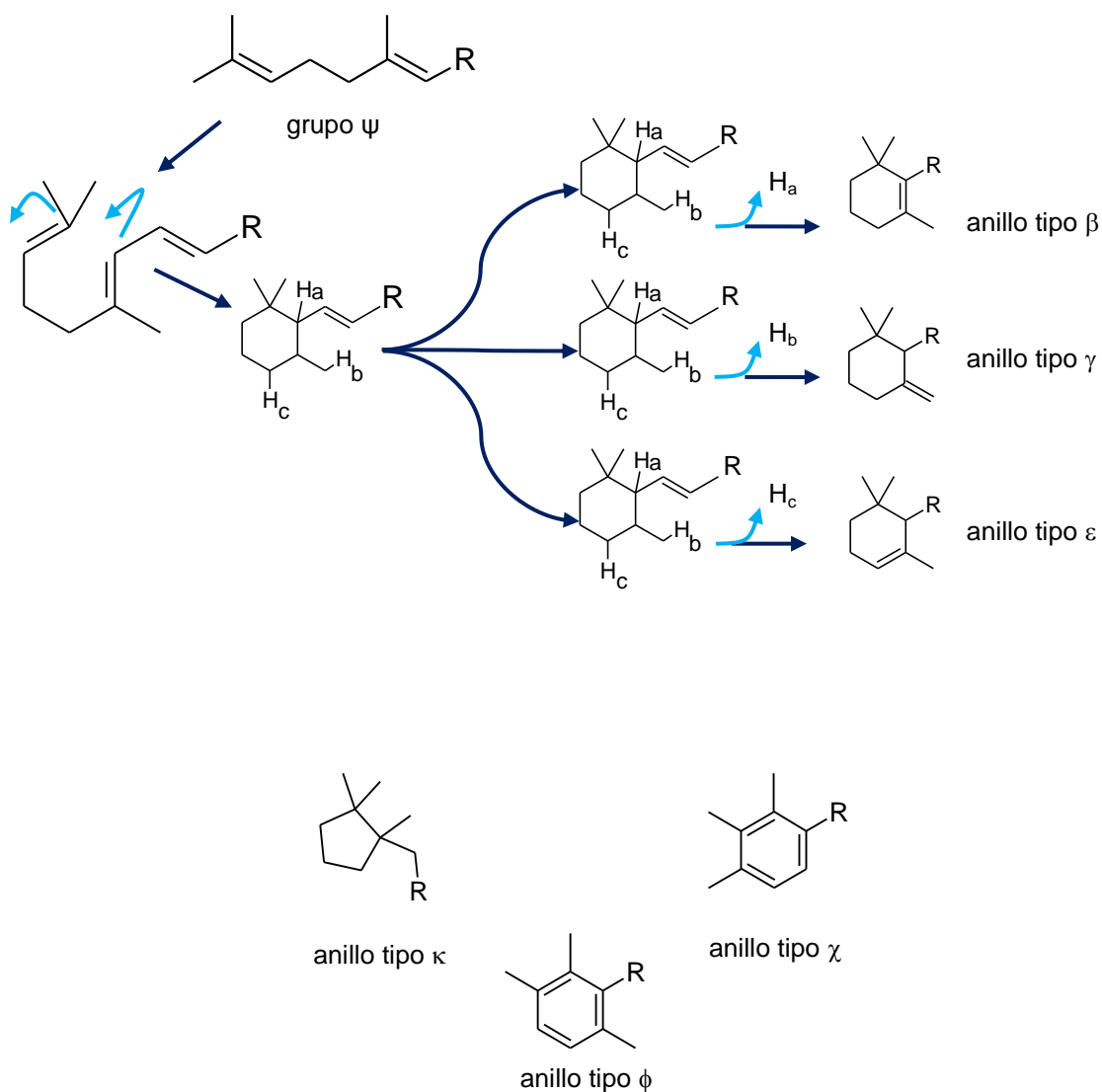


Figura 2.- Configuración de los diferentes grupos presentes a ambos lados de la cadena polienoica para conformar la estructura de carotenoides C₄₀.

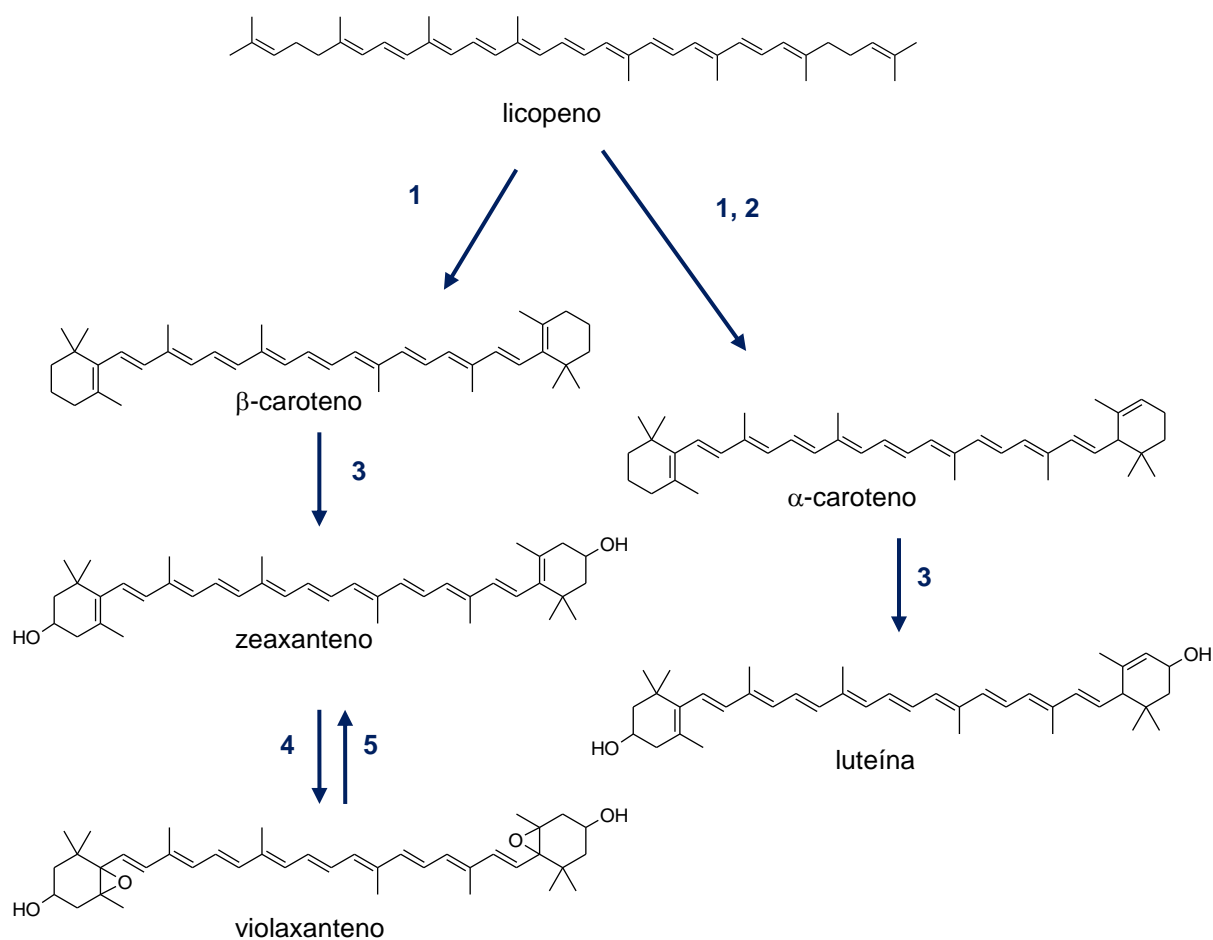


Figura 3.- Generación de diferentes carotenos y xantofilas a partir de licopeno, mediante la participación de enzimas β -ciclase (1), ϵ -ciclase (2), hidroxilasa (3), epoxidasa (4), de-epoxidasa (5).

A pesar de su amplia distribución, y de que se han descrito más de 700 pigmentos carotenoides diferentes, lo normal es encontrar una mezcla común, más o menos compleja, de algunos de ellos. En los cloroplastos de las plantas superiores, la mezcla de pigmentos estaría formada generalmente, por α - y β -caroteno, β -criptoxanteno, zeaxanteno, luteína, violaxanteno y neoxanteno. Algunos pigmentos menos frecuentes como rodoxanteno, y semi- β -carotenona se han descrito en los cloroplastos de las hojas de algunos miembros de las cupresáceas y taxáceas (Goodwin y Britton, 1988).

Se encuentran también en diversos frutos, siendo los responsables de su color, de composición cualitativa simple o compleja. Así, el tomate (*Lycopersicon esculentum*) debe su color rojo a licopeno que constituye el 90% de su composición total carotenoides, mientras que el fruto del pimiento (*Capsicum annuum* L.) contiene una mezcla más compleja, con 8 carotenoides, siendo capsanteno el pigmento mayoritario. Otros frutos como la piña (*Ananas comosus* L.) contiene hasta 21 pigmentos incluyendo isómeros, con violaxanteno, luteoxanteno, neoxanteno y β -caroteno como pigmentos mayoritarios. La naranja (*Citrus sinensis* L.) también tiene un amplio perfil carotenoides con luteoxanteno y auroxanteno como pigmentos más representativos (Gross, 1987). En los tejidos reproductivos de las plantas superiores es posible encontrar pigmentos carotenoides muy específicos como lilixanteno en especies de lirio, o crocetina en especies de *crocus*. Hasta 40 pigmentos se han encontrado en los pétalos de flores, muchas veces en forma de isómeros *cis*. Eschscholxanteno es un ejemplo de un carotenoides específico, en este caso de la amapola californiana.

Resulta habitual que las xantofilas presentes en frutos y vegetales no estén en sus formas libres sino esterificadas por ácidos grasos. Este hecho se puso de manifiesto por Kuhn y Winterstein en 1930 al aislar ésteres de luteína de los pétalos del girasol (*Helianthus annuus*). La ruta y mecanismos que conducen a la esterificación de xantofilas no están establecidos, aunque se asume la participación de la enzima acil-CoA a pesar de que no se han realizado estudios detallados sobre este tema. Con la esterificación, el sistema metabólico de la planta consigue aumentar la liposolubilidad de las xantofilas, lo que se asocia con distintos propósitos. Primero, el proceso de esterificación coincide con la senescencia del vegetal y maduración de

sus frutos (Goodwin, 1980). En segundo lugar, puesto que las enzimas que metabolizan la síntesis de nuevos carotenoides están asociadas a la membrana de los plastoglóbulos, el transporte de compuestos intermedios resulta más fácil si éstos están esterificados (Yamamoto y Higashi, 1978; Spurgeon y colaboradores, 1979). Finalmente, la mayor liposolubilidad de los ésteres promueve su acumulación en plastoglóbulos ricos en triglicéridos lo que incrementa la intensidad colorante del tejido y aumenta el atractivo de la flor o el fruto acentuando las posibilidades de diseminación de su polen y semillas (Britton, 1998).

Se pueden encontrar varios estudios sobre la presencia de ésteres de xantofilas en alimentos (Khachik y Beecher, 1988; Breithaupt y Schwack, 2000; Breithaupt y colaboradores, 2002a; Mezdari y colaboradores, 2005). Incluso se podrían distinguir alimentos naturales con un perfil de xantofilas libre, o esterificado. Ejemplos de frutas y verduras cuyo contenido en xantofilas está esterificado serían la piña (*Ananas comosus* L.), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), variedades de pimiento dulce y picante (*Capsicum frutescens* L.; *Capsicum annuum* L.), naranja clementina (*Citrus reticulata* Blanco), mango (*Mangifera indica* L.), naranja (*Citrus sinensis* Pers.), papaya (*Carica papaya* L.), melocotón (*Prunus persica* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.), y calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Entre las frutas y verduras de contenido en xantofilas libre destacan el plátano (*Musa × paradisiaca* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), maíz (*Zea mays* L.), limón (*Citrus limon* L.), espinaca (*Spinacea oleracea* L.), y tomate. La presencia de ésteres de xantofilas en nuestra dieta resulta pues importante lo que incrementa el interés sobre el estudio del efecto de la esterificación en la absorción de xantofilas.

Al contrario de lo que sucede en los cloroplastos de las plantas superiores, en los de las algas se presentan en mezclas complejas, que tienden a ser características de cada clase. La excepción es la clase *clorofita*, cuyos miembros tienden a acumular los mismos pigmentos que las plantas superiores pero con la inclusión de algunos muy específicos como el sifonaxanteno presente en varias caulerpales.

Los carotenoides sintetizados por bacterias fotosintéticas se caracterizan por ser acíclicos con grupos hidroxilo terciarios frecuentemente metilados en las posiciones C1 y C1', como por ejemplo el espirilloxanteno. En el caso de las bacterias no fotosintéticas la aparición

de carotenoides es esporádica destacando la síntesis de carotenoides con más de 40 carbonos en flavobacterias y de menos de 40 en algunos estafilococos. En los hongos, la síntesis de pigmentos suele ser muy caprichosa, aunque se destaca ficomicetes por la síntesis predominante de β -caroteno. No es habitual la presencia de xantofilas estructuralmente similares a las sintetizadas por las plantas superiores (Goodwin, 1992).

En los animales, como se ha comentado anteriormente, es posible encontrar carotenoides en diversos tejidos, cuya procedencia es la dieta. Existen tanto en forma inalterada, como oxidados o reducidos. Hasta hace poco la ruta oxidativa era la única que explicaba la amplia distribución de carotenoides oxigenados en animales marinos. Sin embargo es posible que en pescado, pollo y otros animales, pigmentos como astaxanteno y cantaxanteno puedan ser reducidos, previa transformación en derivados hidroxilados, a β -caroteno. Esta hipótesis explicaría cómo obtienen los animales marinos una fuente de vitamina A, pues acumulan grandes cantidades de ceto-carotenoides (que no tienen actividad de provitamina A) pero no β -caroteno como tal, que sí es precursor de vitamina A. La asociación de pigmentos carotenoides y proteínas origina el color azul oscuro del caparazón del cangrejo y el rojo de los huevos de pomácea. Los pigmentos verdes del exoesqueleto del cangrejo de río turco son resultado de la coexistencia de carotenoproteínas verdes y amarillas. La coloración de las plumas de diversos pájaros como el flamenco, el verderón, el jilguero, se debe a la presencia de pigmentos carotenoides (Stradi y colaboradores, 1995). En el plasma humano se ha descrito la presencia de hasta 14 carotenoides entre ellos, α - y β -caroteno, licopeno, β -criptoxanteno, zeaxanteno y luteína, astaxanteno y cantaxanteno (Krinsky y colaboradores, 1958; Ohmacht y colaboradores, 1987). Zeaxanteno y luteína son los pigmentos mayoritarios en la retina del ojo humano (Handelman y colaboradores, 1988).

Contenido carotenoide en alimentos y valores de ingesta media

A pesar de que el número de carotenoides descritos en la Naturaleza alcanza una cifra superior a 700, no todas las fuentes naturales que los contienen están presentes en nuestra dieta habitual. Se estima que sólo tenemos acceso a unos 40 carotenoides, que pueden ser absorbidos, metabolizados y/o utilizados en nuestro organismo. El número se reduce a 5 si consideramos el perfil carotenoide que generalmente se detecta en el plasma sanguíneo humano. Este grupo incluye α - y β -caroteno, licopeno, β -criptoxanteno, y luteína, presentes de forma habitual en los alimentos que se exponen en la Tabla 1. El contenido carotenoide en los alimentos reflejados en dicha tabla y en otros se puede consultar en bases de datos elaboradas a tal efecto. La base de datos de Mangels y colaboradores, publicada en 1993, sólo incluía a frutas y vegetales como alimentos proveedores de carotenoides. Posteriormente, se elaboró una nueva base de datos que también incluía otros alimentos como aceites vegetales, mantequilla, huevos, quesos, y otros productos elaborados a base de vegetales (pizzas, ensaladas, etc.) publicada por Holden y colaboradores en 1999. Evalúa hasta 200 referencias sobre el contenido carotenoide de 215 alimentos, tabulando el contenido medio y desviación estándar así como el número de estudios realizados por cada alimento. Está disponible en la siguiente dirección, www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp. Uno de los principales usos de esta base de datos es la estimación del aporte de provitamina A que suministra una determinada ingesta. La actividad de provitamina A y la posterior conversión a retinol en nuestro organismo es la principal función que desempeñan los carotenoides, entre otras, como se detalla más adelante. Otra base de datos sobre el contenido medio de carotenoides en alimentos es la que ofrece el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA Agricultural Research Service, 2005).

En la lista de nutrientes incluidos en esta base de datos, que se puede consultar en la siguiente dirección, www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR18/nutrlist/sr18list.html, se incluyen datos sobre α - y β -caroteno, licopeno, β -criptoxanteno, zeaxanteno y luteína. A pesar de la correlación entre un alto contenido de carotenoides en plasma, que proceden exclusivamente de la ingesta de alimentos ricos en carotenoides, y un menor riesgo a

desarrollar procesos degenerativos severos, no se han establecido niveles de ingesta adecuados de estos componentes, ya que el efecto positivo en la salud se puede deber a otros constituyentes que acompañan a los carotenoides en la ingesta. Ni las acciones biológicas que estos compuestos pueden realizar en nuestro organismo en beneficio para la salud (capacidad antioxidante, potenciación del sistema inmune, incremento de la comunicación intercelular) ni el hecho de que algunos de ellos muestren actividad de provitamina A, han sido razones suficientes para establecer, de momento, una recomendación sobre la cantidad apropiada de carotenoides a ingerir. Sin embargo, sí se pueden establecer valores habituales de ingesta de carotenoides, que podrían asociarse con un menor riesgo a desarrollar procesos degenerativos (cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.), utilizando datos de los estudios epidemiológicos realizados sobre el consumo de frutas y vegetales y su efecto en la salud. Aún así, existen discrepancias en el valor medio de ingesta, según las referencias consultadas. De esta forma, los individuos que siguen una dieta rica en ese tipo de alimentos, ingieren aproximadamente 6 mg/día según los estudios de Lachance (1997) o el publicado en la guía Health Canada (1997). Sin embargo, el estudio publicado por el WCRF/AICR (1997) eleva el valor de ingesta media a 9-18 mg/día. Por los estudios de intervención realizados con dietas de contenido controlado en carotenoides se sugiere que una ingesta de 3 a 6 mg/día de carotenoides es suficiente para mantener los niveles en plasma de estos componentes (Micozzi y colaboradores, 1992; Yong y colaboradores, 1994; Zino y colaboradores, 1997).

Tabla 1.- Frutas y verduras que aportan los principales carotenoides de la dieta humana.

zeaxanteno+luteína	licopeno	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxanteno
col	tomate	zanahoria	zanahoria	aguacate
espinacas	sandía	repollo	albaricoque	naranja
brócoli	pomelo	calabaza	mango	papaya
guisantes	papaya	pimiento	col	fruta de la pasión
coles de bruselas	guayaba	arándanos	pimiento	pimiento
repollo			espinacas	caqui
lechuga			brócoli	
maíz				
yema de huevo				

Carotenoides como colorantes en la industria alimentaria

El color es una de las principales cualidades organolépticas utilizadas por el consumidor como criterio de selección de los alimentos que consume. En productos naturales como frutas y verduras el color apropiado y representativo de cada producto se asocia con propiedades como autenticidad, frescura o buen estado de conservación, y de mayor capacidad nutritiva o saludable. Por ello, la mejora y selección de especies de frutas y verduras que, de forma natural, presenten el contenido carotenoide adecuado y apreciado por el consumidor, es la principal estrategia utilizada en el desarrollo de esos alimentos (Verrips y colaboradores, 2001). El consumidor busca aquellas mismas propiedades en otros alimentos como pescados, crustáceos y huevos, también a través del color, siendo éste su primer indicador de calidad (Henry, 1996). En estos casos, la estrategia utilizada para asegurar el color adecuado es incorporar pigmentos carotenoides en la alimentación del animal, durante su cría en piscifactorías y granjas, que selectivamente retiene estos pigmentos y los deposita en tejidos, puesto que de forma natural está biológicamente preparado para ello (Baker y Günther, 2004). Este hecho le confiere a este uso de la coloración una connotación próxima a lo natural puesto que los carotenoides se encuentran en la dieta que habitualmente esos animales consumirían en libertad.

Finalmente los carotenoides se utilizan para aportar color o corregirlo en varios alimentos procesados como mantequillas y margarinas, quesos, aceites vegetales, salsas, productos cárnicos, condimentos culinarios, bebidas y helados. En estos ejemplos sí se está utilizando la capacidad colorante de los carotenoides intencionadamente para colorear a alimentos que en origen quizás no presentaban coloración o ésta era significativamente inferior a la obtenida una vez finalizado el procesado. Generalmente, se utilizan extractos concentrados de frutos y productos naturales que contienen una gran cantidad de carotenoides, como oleorresinas de pimiento, tomate, y marigold (*Tagetes erecta*), para añadirlos durante el procesado del alimento a colorear. Esta práctica está legislada por una serie de normativas que permiten el uso de determinados concentrados de pigmentos o carotenoides individuales. En la Unión Europea la directiva 95/45/CE hace referencia a la descripción y criterios de pureza de los colorantes permitidos entre los cuales se encuentran diversos extractos de carotenoides y pigmentos

puros tal y como se expone en la Tabla 2. La adición de estos productos como colorantes no pierde del todo la connotación natural ya que se trata de extractos de origen natural con lo que además se neutraliza el rechazo que pueda surgir por parte del consumidor. Además de la coloración, el uso de carotenoides proporciona al alimento dos propiedades a considerar. La primera es el valor de provitamina A que se aporta al alimento cuando éste se colorea con carotenoides como β -caroteno o β -criptoxanteno que tienen esta actividad. La segunda es la actividad antioxidante que todo carotenoide presenta y que se confiere tanto al alimento (reduciendo la auto-oxidación lipídica y aumentando la vida útil del producto) como al consumidor que ingiere el producto coloreado por carotenoides.

Tabla 2.- Carotenoides naturales, o extractos que los contienen, autorizados por la Unión Europea para su uso como colorantes de alimentos.

código	composición carotenoide
E160a	β -caroteno y mezcla de carotenos
E160b	annatto, bixina, norbixina
E160c	(oleorresina de pimiento), capsanteno, capsorrubeno
E160d	licopeno
E160e	β -apo-8'-carotenal
E161b	luteína
E161g	cantaxanteno

Funciones y acciones biológicas de los carotenoides

En este punto se comienza por distinguir las funciones biológicas de las acciones o actividades biológicas. Por función biológica se entiende aquel proceso en el que interviene un componente, y que resulta imprescindible para la vida de un organismo, mientras que las acciones o actividades biológicas son respuestas fisiológicas o farmacológicas que se observan después de la ingesta de alimentos o suplementos dietéticos ricos en determinados constituyentes.

Funciones biológicas

Los carotenoides tienen como principal función biológica en los organismos fotosintéticos, la transferencia energética en la fotosíntesis y en la fotoprotección (Krinsky, 1994). En los mamíferos la principal y única función biológica de algunos carotenoides es su rol como precursores de la vitamina A, necesaria para la visión, el crecimiento, la diferenciación celular, y otros procesos fisiológicos (Olson, 1996). No todos los carotenoides tienen los requerimientos estructurales para su conversión en vitamina A. Sólo aquellos que presentan al menos un anillo tipo β , sin funciones oxigenadas, junto con una cadena polienoica que contenga al menos 11 átomos de carbono son potenciales precursores de vitamina A. Así de los 700 carotenoides descritos, un 10% muestran actividad de provitamina A. Los más importantes, tanto por su alta actividad como por su presencia, son α - y β -caroteno, y algunas xantofilas entre las que destacan β -criptoxanteno y algunos apo-carotenoides (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1997). De todos, β -caroteno tiene la mayor actividad de provitamina A puesto que cada molécula de pigmento produce dos de retinal que es reducido a vitamina A (retinol). En la Tabla 3 se exponen los carotenoides más representativos que tienen actividad de provitamina A y su actividad relativa a β -caroteno.

Tabla 3.- Actividad de provitamina A de carotenoides según Bauernfeind (1972) y Zechmeister (1949).

carotenoide	actividad (%)
<i>all-trans</i> - β -caroteno	100
9- <i>cis</i> - β -caroteno	38
13- <i>cis</i> - β -caroteno	53
<i>all-trans</i> - α -caroteno	53
9- <i>cis</i> - α -caroteno	13
13- <i>cis</i> - α -caroteno	16
<i>all-trans</i> - β -criptoxanteno	57
9- <i>cis</i> - β -criptoxanteno	27
15- <i>cis</i> - β -criptoxanteno	42
β -caroteno-5,6-epóxido	21
mutatocromo	50
γ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno	20-40

Acciones biológicas

Una de las primeras acciones descritas fue la caracterización de los carotenoides como *quenchers* muy eficaces de oxígeno singulete (Foote y Denny, 1968). El mecanismo se basa en un proceso físico por el cual, el exceso energético de la molécula de oxígeno es absorbido por el pigmento, devolviendo a la molécula de oxígeno a su estado energético basal. El pigmento, dispersa térmicamente el exceso energético adquirido, sin provocar daños a otras moléculas vecinas. La reiteración de este proceso termina destruyendo al pigmento mediante reacciones químicas que implican la adición del oxígeno singulete a la estructura del carotenoide dando lugar a endoperóxidos y derivados carbonílicos. Aunque una sola molécula de β -caroteno puede desactivar a 1000 moléculas de oxígeno singulete antes de ser oxidado, dicha oxidación irreversible tiene lugar, lo que pone límites a la efectividad como *quencher* del pigmento (Liebler, 1993). No obstante, el efecto positivo de la acción queda fuera de dudas y existe un enorme interés en el desarrollo de compuestos químicos de síntesis en los que se combinen la excelente eficiencia de los carotenoides como *quenchers* con la habilidad de los flavonoides de estabilizar a los radicales intermedios formados en este proceso. Es posible sintetizar componentes que resultan de la fusión de esos dos grupos de constituyentes originando carotenilflavonoides que presentan una mayor capacidad *quencher* y mejor estabilidad, con aplicaciones potenciales en cremas solares (Beutner y colaboradores, 2007).

Posiblemente, ninguna otra acción biológica de los carotenoides suscite mayor interés y controversia que la actividad/capacidad antioxidante. Para aclarar el concepto y dónde pueden surgir las dudas sobre la eficiencia de carotenoides como antioxidantes, se debe distinguir la actividad antioxidante, asociada a procesos oxidativos *in vitro* o formalmente químicos, de la capacidad antioxidante, asociada a procesos oxidativos *in vivo* que implica realmente una acción biológica.

El término actividad antioxidante se define como la constante de velocidad de la reacción entre un antioxidante y un radical libre. Este concepto se correlaciona con el proceso químico de reacción del par antioxidante/radical, la estructura de ambas sustancias y el mecanismo o mecanismos de reacción que tienen lugar. Los antioxidantes pueden reaccionar con los radicales principalmente mediante dos mecanismos, abstracción de hidrógeno, o transferencia

electrónica, cesión que se realiza en ambos casos desde la especie antioxidante al radical. Los dos mecanismos pueden transcurrir en paralelo y el proceso dominante dependerá de la estructura del antioxidante y de las características del entorno de reacción, así como de la especie radicalaria. Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se pueden basar en uno u otro mecanismo, o incluso en ambos. Para los carotenoides, los métodos de determinación de actividad antioxidante generalmente aplicados son el método de Terao (1989) y el método TRAP (Bartosz y colaboradores, 1998), métodos que utilizan radicales que reproducen los procesos de auto-oxidación lipídica. Los carotenoides muestran actividad antioxidante frente a radicales lipofílicos, que son especies reactivas de oxígeno (EROS) producidas durante la oxidación de lípidos. Cada pigmento carotenoide presentará una actividad antioxidante diferente en función de sus peculiaridades estructurales, que le permitirán reaccionar según alguno de los dos mecanismos de reacción posibles, transferencia electrónica, abstracción de hidrógeno, y un tercer proceso denominado reacciones de adición.

En el primer proceso, radicales como el triclorometil peroxilo (un radical que causa toxicidad en el hígado) y el radical dióxido de nitrógeno (un radical procedente del humo del tabaco) convierten a los carotenoides en radicales catiónicos que pueden reaccionar con sustratos biológicos y producir daño oxidativo (Everett y colaboradores, 1996; Miller y colaboradores, 1996). Este proceso tiene lugar, preferentemente, cuando el potencial redox del radical es lo suficientemente alto para producir la transferencia electrónica (Everett y colaboradores, 1996).

En el caso de radicales formados durante los procesos de auto-oxidación lipídica la transferencia electrónica no es el mecanismo de reacción sino que ésta transcurre mediante la abstracción de hidrógeno y un tercer proceso, la adición radicalaria en la cadena polienoica. El proceso de adición implica que la oxidación tiene lugar mediante la doble adición de las especies radicalarias a la cadena polienoica, lo que genera un aducto bis-peroxilo que puede experimentar un proceso de rotura heterolítica u homolítica (Liebler, 1993; Ríos y colaboradores, 2008). En el proceso heterolítico no se regeneran radicales, mientras que la rotura homolítica produce dos nuevas especies reactivas lo que implica un proceso auto-oxidativo. Si la adición se produce en el anillo se genera el correspondiente epóxido 5,6 y un

radical lo que supone de nuevo un proceso auto-oxidativo. El otro proceso de reacción es el mecanismo de abstracción de hidrógeno que afecta a los átomos en posiciones alílicas a un doble enlace y por tanto más susceptibles de ser abstraídos por radicales peroxilo. Este proceso genera una especie reactiva que continúa la cadena de propagación radicalaria.

Aunque los mecanismos de reacción sean comunes la velocidad a la que transcurren está determinada por la presencia de grupos funcionales por lo que las características estructurales de cada carotenoide condicionarán su oxidación y por tanto la actividad antioxidante que presenta. En concreto resulta clave el radical intermedio caroteno-peroxilo, cuya estabilización por deslocalización electrónica es distinta en función de los grupos funcionales que se sitúan en los extremos de la cadena polienoica. Además dichos grupos pueden impedir el transcurso oxidativo a través de alguno de los mecanismos de reacción comentados y por tanto disminuir la tendencia a la auto-oxidación (Liebler, 1993; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002).

En la Figura 4 se reproducen los mecanismos de reacción comentados anteriormente. Se puede observar cómo la posibilidad de que durante el desarrollo del proceso antioxidante, el compuesto carotenoide produzca nuevas especies radicalarias que incrementen el potencial oxidativo del entorno. Cuando la generación de especies radicalarias supera a la velocidad con que el antioxidante las elimina, se produce la auto-oxidación del mismo.

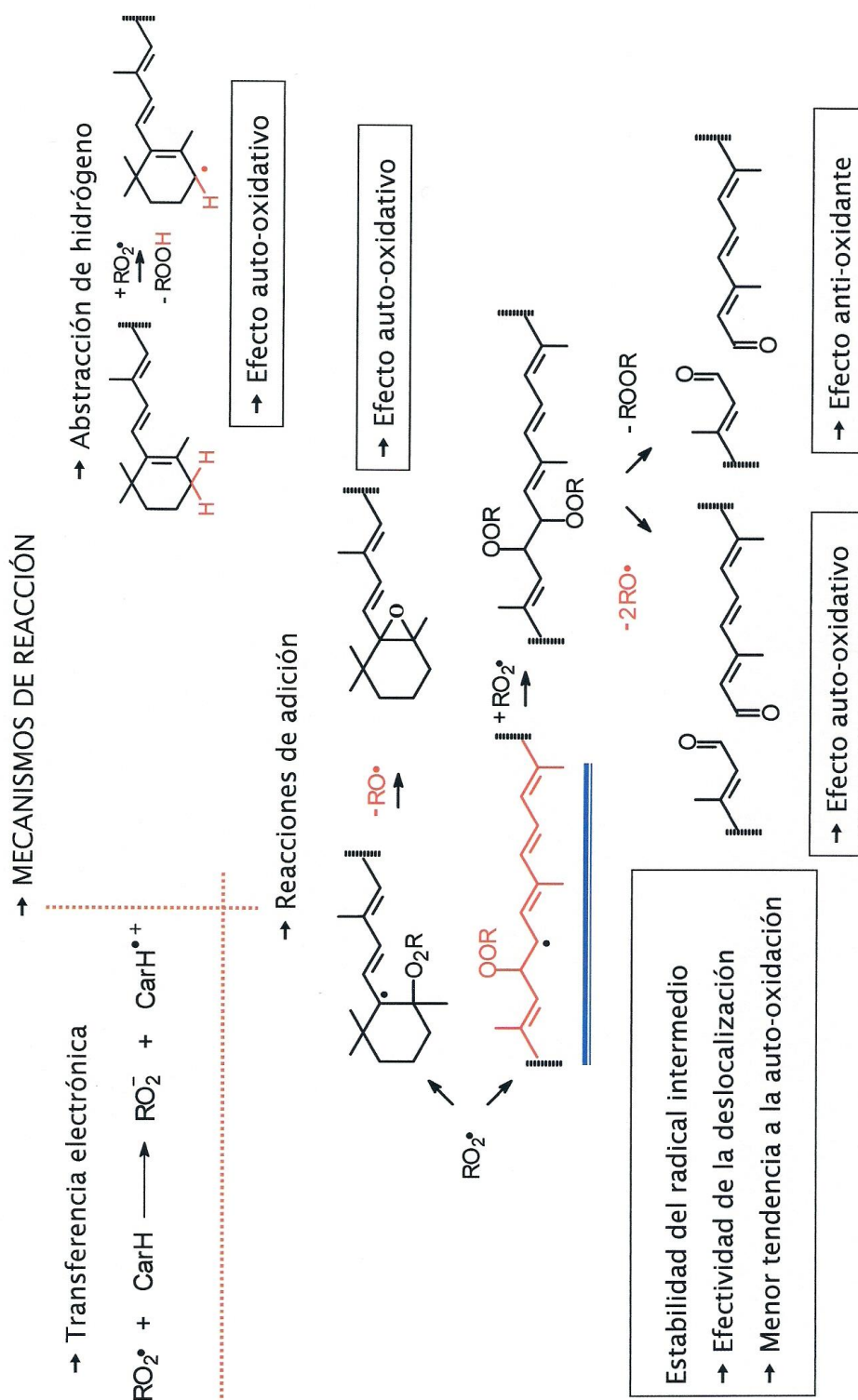


Figura 4.- Mecanismos de reacción de carotenoides con radicales libres. Procesos de auto-oxidación generados y efecto que produce la reacción en su entorno.

El concepto actividad antioxidante está más asociado a los procesos formalmente químicos que ocurren en la reacción del par antioxidante/radical. No cabe duda que las propiedades de estos procesos repercuten en la capacidad antioxidante, que es el segundo concepto a definir. Ésta se define como la cantidad de especies radicalarias que es eliminada o neutralizada del medio de reacción, por la acción de una determinada cantidad de antioxidante. Este concepto es el que se aplica a la acción de antioxidantes en tejidos y muestras biológicas como plasma, epitelio, cultivos celulares, etc. Los métodos de medida de capacidad antioxidante que se han aplicado a carotenoides son el método TEAC (Re y colaboradores, 1999), el método DPPH (Brand-Williams y colaboradores, 1995) y el método de oxidación *ex vivo* de lipo-proteínas de baja densidad (LDL). Estas medidas constituyen una aproximación (más o menos realista) a la capacidad antioxidante de carotenoides, su principal acción biológica. En los sistemas biológicos, los lípidos constituyen gran parte de la membrana celular y de otras estructuras subcelulares. La oxidación lipídica tiene consecuencias negativas en la funcionalidad de la membrana y su integridad. Puesto que los carotenoides se alojan en esas mismas estructuras van a cortar la cadena de propagación radicalaria generada por la oxidación lipídica, por lo que estos compuestos, junto con los tocoferoles son denominados antioxidantes de membrana.

El efecto antioxidante de carotenoides *in vivo* se observa en LDL y membranas celulares donde ejercen su capacidad mediante los mecanismos de reacción anteriormente mencionados (Ringer y colaboradores, 1991). El hecho de que los carotenoides ejerzan esta capacidad en los sistemas biológicos es el principal apoyo a la teoría antioxidante sobre una ingesta elevada en alimentos ricos en carotenoides y un menor riesgo a desarrollar procesos degenerativos. Y aquí es donde surge la controversia, puesto que no todos los estudios de intervención apoyan esta hipótesis. Muchos de estos estudios arrojan resultados inconsistentes (Krinsky, 1994; Rock y colaboradores, 1996) debido al concurso de varios factores que determinan la falta de correlación. Algunos factores a mencionar son los niveles de asimilación de los antioxidantes presentes en la dieta, es decir, qué proporción de lo ingerido es asimilado y por tanto biodisponible, su posible biotransformación en otros compuestos de menor eficiencia antioxidante o la generación de nuevos radicales libres, tal y como se ha indicado en la exposición del concepto actividad antioxidante, la cantidad que se deposita en el tejido donde

va a desarrollar su acción, y el marcador de estrés oxidativo utilizado para determinar la correlación. La conjunción de estos factores propicia que se puedan encontrar resultados que apoyan la correlación (Upritchard y colaboradores, 2003) o todo lo contrario (Alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study group, 1994; Omenn y colaboradores, 1996).

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los estudios epidemiológicos indican que el consumo de alimentos ricos en carotenoides está correlacionado con un menor riesgo a desarrollar procesos degenerativos, entre los que se encuentran algunos tipos de cáncer. La implicación de los carotenoides en limitar la aparición de esta enfermedad deriva de su interacción con tres marcadores biológicos relacionados con el cáncer: estrés oxidativo radicalario, actividad del sistema inmune, y modulación de la comunicación intercelular (Figura 5).

Si la iniciación y progresión de procesos cancerosos está relacionada con la presencia de radicales libres, resulta lógico suponer que la incorporación de antioxidantes como los carotenoides a nuestro organismo contribuirá positivamente a disminuir las posibilidades de aparición de este proceso degenerativo. Existen evidencias acerca de la implicación de radicales libres en la iniciación y progresión de la carcinogénesis. Las EROS actúan directamente como mutágenos al oxidar las bases del ADN y también son capaces de activar pre-carcinógenos convirtiéndolos en compuestos reactivos que modifican el ADN (Marnett, 1987). El descenso continuado en la defensa antioxidante que provoca la actividad de la EROS es otra evidencia de su implicación en la carcinogénesis ya que este efecto también ocurre por la actividad de auténticos carcinógenos (Cerutti, 1985; Kensler y Taffe, 1986). Consecuentemente, si los carotenoides intervienen como antioxidantes frenando la actividad de EROS, su acción puede disminuir el riesgo a desarrollar cáncer (Malone, 1991; Byers y Perry, 1992; Voorrips y colaboradores, 2000; Holick y colaboradores, 2002).

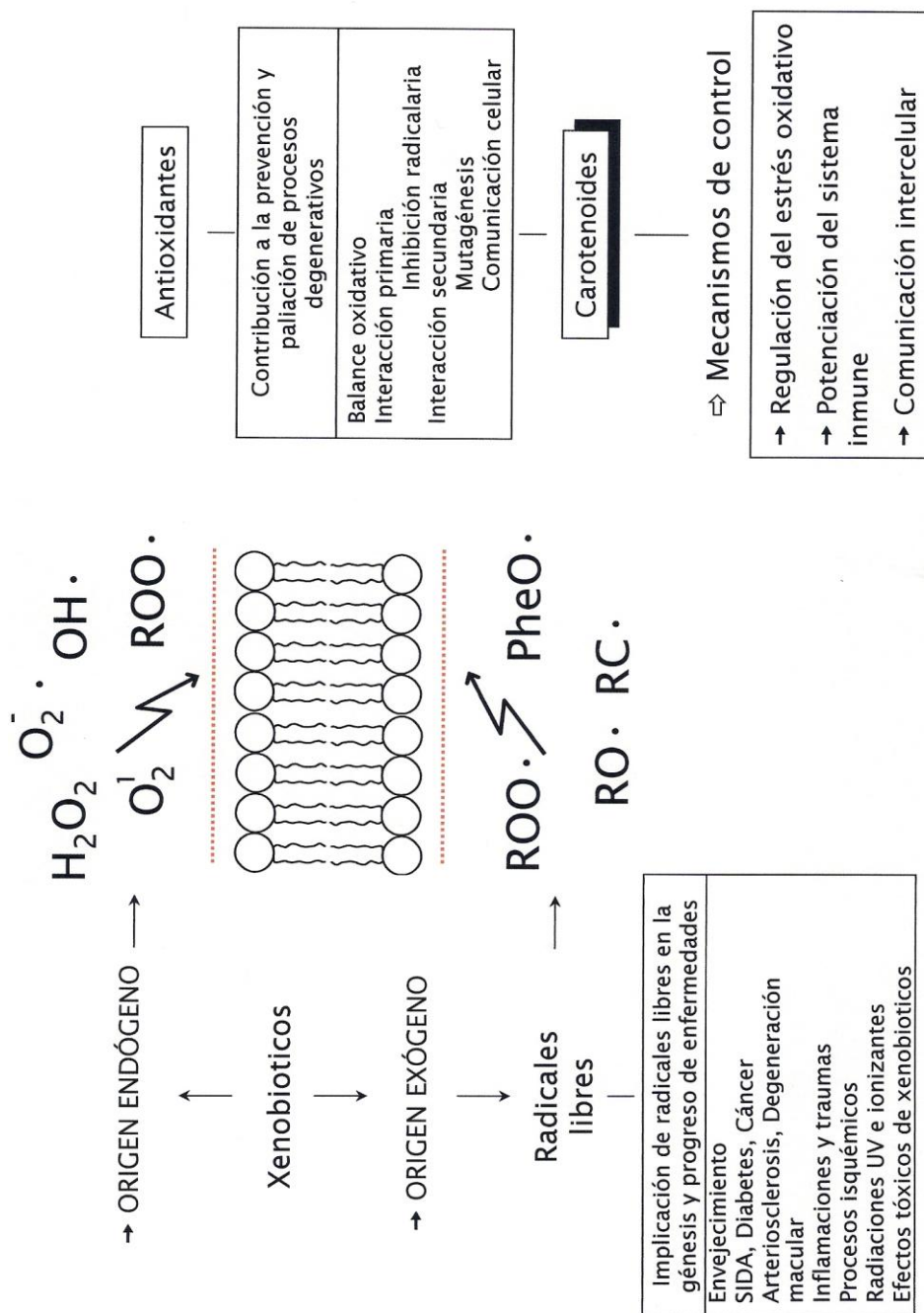


Figura 5.- Procesos degenerativos derivados de la actividad de radicales libres paliados por la bioactividad de compuestos antioxidantes como los carotenoides y otros posibles mecanismos de control.

De la capacidad antioxidante de carotenoides también resulta otro efecto beneficioso, la potenciación del sistema inmune. La radiación ultravioleta (UV) produce un incremento en la concentración de radicales libres que deteriora el sistema inmunológico, por lo que la intervención de antioxidantes naturales limita el efecto negativo y retrasa la aparición de marcadores sensibles a la disminución del sistema inmunológico. Los estudios de Fuller y colaboradores (1992) y Herraiz y colaboradores (1998) muestran el efecto de la ingesta de suplementos de β -caroteno en el sistema inmune de personas sometidas a radiación UV. El efecto positivo observado, resultado de un proceso antioxidante, se incrementa cuantitativamente en personas de mayor edad. Pero los carotenoides pueden modificar la función del sistema inmune mediante mecanismos no antioxidantes lo cual también tiene su trascendencia positiva, en el riesgo a desarrollar cáncer, debido al rol esencial que cumple el sistema inmunológico en la prevención de este proceso degenerativo. Se ha demostrado que la ingesta de suplementos de β -caroteno incrementa la actividad de células tipo NK, *natural-killers*, que reducen la posibilidad de formación de tumores (Santos y colaboradores, 1996). En este caso el mecanismo por el que β -caroteno modula la actividad celular no se conoce. También se ha sugerido que la regulación de la biosíntesis de la prostaglandina E_2 , reconocido inmuno-supresor, se debe a la intervención de β -caroteno en la potenciación del sistema inmune (Halevy y Sklan, 1987). Se puede observar que la mayoría de los estudios realizados se centran exclusivamente en β -caroteno. La experimentación con otros carotenoides y su efecto en la función inmune son muy escasas y no han arrojado resultados concluyentes ni positivos (Hughes y colaboradores, 2000).

La mejora de la comunicación intercelular es el tercer marcador que correlaciona inversamente la concentración plasmática de carotenoides con la progresión del cáncer. En este caso el mecanismo de acción no se basa en la acción antioxidante ya que en diversos estudios realizados sobre el efecto inhibitor de carotenoides en la proliferación de células neoplásicas no se encontró correlación entre ese efecto y la capacidad antioxidante. De hecho, la adición de otros antioxidantes de membrana como α -tocoferol no mostró efecto inhibitor alguno lo que parece corroborar la presencia de un mecanismo de acción diferente. En este

caso el mecanismo de acción está ligado a la capacidad de los carotenoides de aumentar, o restablecer, la comunicación intercelular que tiene lugar a través de canales o poros denominados conexones. A través de estos poros las células intercambian diversas moléculas señalizadoras, entre ellas agentes antiproliferativos.

En las células cancerosas la comunicación intercelular está interrumpida debido a que la expresión génica de la proteína que forma parte estructural de esos poros o canales de comunicación, la conexina 43, está disminuida. A consecuencia de ello las células cancerosas se comunican poco con las células normales que la rodean, por lo que no reciben información de su entorno, lo que supone la pérdida de control de la proliferación sobre las células transformadas (Loewenstein, 1979). Por el contrario, si se restablece la comunicación intercelular entre las células normales y las cancerosas, se tendría la oportunidad de frenar su proliferación. En varios estudios se ha demostrado que los carotenoides incrementan la expresión del gen que codifica la conexina 43, lo que aumenta la comunicación intercelular con el tejido sano y disminuye la proliferación de células transformadas. El mecanismo de regulación de la expresión génica por mediación de los carotenoides se desconoce. La hipótesis más extendida es que los carotenoides, y particularmente algunos productos de su metabolismo, son capaces de activar una serie de receptores nucleares (RAR- α y RXR- α) que activan la expresión génica.

Carotenoides en el contexto de la dieta funcional

Existe una gran variedad de evidencias epidemiológicas sobre el efecto protector de la ingesta de frutas y vegetales frente a varios procesos degenerativos a partir de los estudios realizados en diversas poblaciones, que presentan preferencias diferentes por varios tipos de frutas y vegetales (Gramenzi y colaboradores, 1990; Hertog y colaboradores, 1993; Knekt y colaboradores, 1994; Key y colaboradores, 1996; Law y Morris, 1998; Fung y colaboradores, 2001; Hirvonen y colaboradores, 2001; Joshipura y colaboradores, 2001; Sasazuki, 2001). Estas circunstancias han conducido a los organismos de salud pública a realizar campañas de promoción para incrementar el consumo de estos alimentos, siendo la más conocida de todas la campaña *five-a-day*, cinco-al-día, cuya promoción en España se puede consultar en la página www.5aldia.com.

Al incrementar el consumo de frutas y vegetales se consigue aumentar la ingesta diaria de componentes que caracterizan a este tipo de alimentos como vitaminas hidro- y liposolubles, fibra y fitoquímicos (carotenoides, glucosinolatos, fenoles y clorofilas), que son los que producen el efecto beneficioso en la salud. El fundamento científico de este objetivo está, aparte de los estudios epidemiológicos citados anteriormente, en las conclusiones de algunas publicaciones que hacen referencia al efecto beneficioso de alguno de aquellos componentes. Concretamente, el interés en incrementar el consumo de carotenoides, y por ende de los alimentos que los contienen, aparece desde la publicación en el año 1981 del trabajo de Peto y colaboradores, sobre la posibilidad de que β -caroteno disminuyera la incidencia de algunos tipos de cáncer. Estas campañas de promoción han logrado concienciar al consumidor de que a través de la alimentación se puede mejorar o incrementar las expectativas de una vida saludable lo que ha tenido un impacto positivo en el consumo de frutas y vegetales. Así, desde la década de los 70 el incremento en el consumo de estos alimentos ha sido continuado pasando de una media de 2 a 3 raciones a la media actual de 5. En algunos países ya se está lanzando la nueva versión de la campaña cinco-al-día, con el lema *fruits and veggies – more matters*, www.fruitsandveggiesmorematters.org, que incluye la promoción del consumo de frutos secos.

En este contexto de alimentos naturales, como frutas y vegetales, es donde surge el concepto de alimento funcional y toda la revolución saludable de los últimos años. Éste se define como aquel alimento o ingrediente que tiene un impacto positivo en la salud del individuo más allá de su valor nutritivo, mediante mecanismos de acción que mejoran el estado de salud y bienestar (Roberfroid, 2002). Esta definición implica que alimentos naturales como las frutas y vegetales sean alimentos funcionales y es en este contexto en el que los carotenoides tienen mayor representación ya que ese grupo de alimentos es la principal fuente de estos compuestos bioactivos.

Pero el concepto de alimento funcional implica además la modificación o diseño de alimentos, necesitando para ello de la aplicación de un procesado, ya que alimentos funcionales también son aquellos en los que un componente se ha eliminado, o alimentos en los que la naturaleza de uno o más compuestos se ha modificado, alimentos en los que la bioaccesibilidad de uno o más componentes se ha modificado, o cualquier combinación entre las posibilidades anteriores. En estos ejemplos se aprecia la importancia del desarrollo tecnológico que ha experimentado la industria agroalimentaria en los últimos años, sin el que, el concepto de alimento funcional, quizás no hubiera supuesto una revolución saludable. El uso de tecnología se hace imprescindible cuando se detectan compuestos funcionales en alimentos no frecuentes en la dieta, o que no reúnen las características organolépticas adecuadas para su consumo o bien que no están en la concentración suficiente para realizar el efecto beneficioso (Korhonen, 2002).

¿Estaría justificada la aplicación del contexto tecnológico para introducir carotenoides en otras formulaciones alimentarias? En primer lugar hay que considerar que varias de las frutas y vegetales que consumimos, y que promocionan el programa 5-al-día no están dentro del grupo en el que más consistentes son las evidencias entre su ingesta y el efecto beneficioso. Así se puede contabilizar que sólo un 25% de los vegetales consumidos aporta los componentes fitoquímicos, como los carotenoides, en cantidades relevantes y asociados a un efecto saludable. En las frutas ese porcentaje aumenta hasta el 50% (Johnston y colaboradores, 2000). Este hecho parece abundar más en la idea de focalizar el beneficio saludable en un grupo reducido de compuestos. En segundo lugar, la aplicación de las tecnologías de

purificación adecuadas ha permitido obtener concentrados los compuestos de interés que se han utilizado para la elaboración de alimentos enriquecidos en esos componentes (Ottley, 2000). Finalmente la industria alimentaria ha diseñado alimentos que proporcionan alternativas al consumo de productos naturales y que reúnen ventajas para el consumidor como por ejemplo un mayor periodo de conservación, conveniencia, nuevos sabores, y todo ello con una mejora importante de un parámetro clave en el diseño de estos alimentos: la bioaccesibilidad. Para los carotenoides este parámetro, que indica la cantidad asimilada de un componente respecto al total consumido, alcanza valores máximos del 10% cuando se consumen alimentos naturales (Boileau y colaboradores, 1999). Considerando este bajo porcentaje, sería interesante incluir carotenoides en alimentos procesados o nuevas matrices alimentarias, al objeto de incrementar su bioaccesibilidad.

Las formulaciones alimentarias que constituyen la principal alternativa a los alimentos naturales como aporte de carotenoides, están basadas en matrices hidrofílicas en las que necesariamente estos compuestos se introducen en forma de dispersiones, emulsiones o encapsulados con otros componentes para modificar su liposolubilidad (Richelle, 2002; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2004). Este tipo de formulaciones presentan varias ventajas para el consumidor, permiten la combinación selectiva de varios compuestos funcionales y en la concentración adecuada y, aplicando el criterio de diseño necesario, podrían aumentar la asimilación de dichos compuestos. En cualquier caso, ya sea alimentos naturales o procesados, la consideración del término biodisponibilidad resulta fundamental para avalar las alegaciones sobre el efecto beneficioso en la salud que provoca la ingesta de estos alimentos (Aggett y colaboradores, 2005), especialmente en el caso de compuestos funcionales como los carotenoides, cuya eficiencia de asimilación depende de varios factores relacionados con las características de la matriz alimentaria que los contiene y de las del resto de alimentos co-ingерidos, como se expone en el apartado siguiente.

Biodisponibilidad de carotenoides

Puesto que dependemos de la dieta para incorporar carotenoides a nuestro organismo, y considerando el efecto beneficioso para la salud de las funciones biológicas de estos compuestos, el estudio de la biodisponibilidad de carotenoides siempre ha sido de interés. El concepto biodisponibilidad procede de la fusión de las palabras disponibilidad biológica (Metzler y Huang, 1983) y su definición ha evolucionado en el tiempo, presentando diferentes significados. El término se acuñó en el campo farmacológico para hacer referencia a la velocidad y extensión con la que el principio activo de un fármaco se absorbe y alcanza el tejido u órgano donde desempeña su actividad. El concepto biodisponibilidad no se desliga de la actividad biológica o bioactividad (ver apartado Acciones Biológicas, p. 25), sino que la incluye en su definición más amplia. Sin embargo, la bioactividad aparece generalmente difuminada en el concepto de biodisponibilidad ya que, farmacológicamente, un principio activo una vez que alcanza su sitio de actividad deja de ser inerte realizando una acción. Parece que la bioactividad es algo obvio. Pero esa obviedad no justifica olvidar bioactividad del término biodisponibilidad. Sin embargo, hay grupos de trabajo que acotan el término de biodisponibilidad haciendo exclusivamente referencia a la fracción de nutriente ingerido que está disponible para su uso en funciones fisiológicas o para su almacenamiento. Otros grupos más puristas sí tienen en cuenta que la biodisponibilidad incluye el concepto de bioactividad y para distinguir éste del resto de eventos fisiológicos y hacer referencia a éstos últimos utilizan otro término: la bioaccesibilidad. La bioaccesibilidad es la suma de digestibilidad y asimilación, y junto con la bioactividad componen el concepto de biodisponibilidad. Esta conjunción de conceptos es la que se utiliza en la presente tesis doctoral.

La digestibilidad especifica a aquella fracción de componentes del alimento que se transforma en materia potencialmente asimilable, e incluye a todos los procesos físico-químicos que tienen lugar en el lumen. Asimilación es la etapa de captación del material bioaccesible por el epitelio mediante alguno de los mecanismos de absorción transepitelial. Hay grupos que, en ocasiones, se refieren a la etapa de digestibilidad como bioaccesibilidad. Otros igualan asimilación con biodisponibilidad y, finalmente, hay publicaciones en los que digestibilidad más

asimilación es igual a biodisponibilidad, como se ha indicado anteriormente, olvidando bioactividad.

Lo más habitual es que la información publicada referente a la bioaccesibilidad de carotenoides se haya obtenido mediante la determinación de la cantidad de carotenoides en plasma después de la ingesta de un alimento o de un suplemento dietético bien en dosis única, estudio post-prandial, bien durante un periodo de tiempo concreto, estudio de suplementación, (Stahl y Sies, 1992; van Vliet y colaboradores, 1995; O'Neill y Thurnham, 1998) y otros recogidos en la excelente revisión de Castenmiller y West (1998). Conocida la dosis total suministrada y la cantidad de carotenoides que se acumula en plasma se estima su bioaccesibilidad. Además, se puede realizar el diseño experimental de forma que se determinen aquellos factores relevantes que modifiquen la digestibilidad o la asimilación, por ejemplo cambiando la composición carotenoide de la ingesta, el tipo de matriz alimentaria que los contiene, incluyendo otros componentes que pueden actuar como interferentes o complementarios, etc. Con esta estrategia se ha conseguido una cantidad apreciable de información aunque el procedimiento estima la influencia de los factores analizados en el conjunto del proceso de absorción sin poder concretar qué factor afecta a cada etapa y en qué medida. Por ello, durante la exposición siguiente de antecedentes, en algunos casos se podrá precisar la etapa modulada por el factor, pero en otros sólo se podrá expresar que el factor modula la bioaccesibilidad.

Digestibilidad: solubilización y micelarización

Es en la etapa de digestibilidad donde se puede considerar un mayor número de factores que modulan el resultado final de este proceso. Los carotenoides, como todos los compuestos lipofílicos requieren de una primera fase de solubilización desde la matriz alimentaria y de una segunda fase de micelarización, es decir, de su incorporación a micelas que son los agregados moleculares que vehiculizan el material lipídico, y lo hacen potencialmente bioaccesible o asimilable por el epitelio intestinal (Figura 6). En la primera fase tiene una importancia significativa el grado de procesado del alimento como factor que maximiza la cantidad de compuesto que se solubiliza desde la matriz. Así, la homogeneización mecánica, la aplicación de tratamiento térmico y la adición de grasa durante el procesado de frutas y vegetales son técnicas que aumentan la eficiencia de esta fase (van het Hof y colaboradores, 1998). Las técnicas comentadas, modifican las estructuras subcelulares en las que se alojan los carotenoides, facilitando su liberación y solubilización (Stahl y Sies, 1992; Gartner y colaboradores, 1997; Paetau y colaboradores, 1998).

En la fase de micelarización, se produce la reducción de tamaño de las partículas lipídicas producidas en la fase anterior y la formación de micelas, agregados moleculares de un tamaño entre 3 y 10 nm, que van a albergar material lipídico, no sólo carotenoides sino también acilglicéridos, colesterol, fosfolípidos. En esta fase intervienen las secreciones de la vesícula biliar y del páncreas. Las primeras consisten principalmente en sales biliares cuya misión es la de coadyuvar en la reducción del tamaño de la micela y su estabilización. Las secreciones del páncreas tienen un contenido acuoso (bicarbonato) que neutraliza el pH del contenido duodenal y aportan las enzimas digestivas entre las que se encuentran las lipasas pancreáticas que hidrolizan triacilglicéridos, ésteres de colesterol, etc. El factor clave en esta fase es la materia grasa ingerida. Su presencia va a estimular las secreciones biliares y los niveles de lipasas pancreáticas lo que aumenta la capacidad de micelarización. Se estima que el consumo de 3 a 5 gramos de grasa incrementa notablemente la bioaccesibilidad de carotenoides (Roels y colaboradores, 1958; Jayarajan y colaboradores, 1980). Sin embargo el tipo de grasa puede desfavorecer este proceso como indican algunos estudios comparativos realizados a tal efecto. La bioaccesibilidad de carotenoides disminuye cuando se ingieren triacilglicéridos de cadena

corta-media en comparación con la bioaccesibilidad estimada con el consumo de triacilglicéridos de cadena larga. Debido al método de estimación aplicado (valoración en plasma de la cantidad carotenoide acumulada tras la ingesta) no es posible diferenciar si este factor incide en esta fase o en la posterior etapa de asimilación (Hollander y Ruble, 1978; Borel y colaboradores, 1998).

Otro factor de importancia en la fase de micelarización es la presencia de fibra soluble. El consumo de fibra disminuye la eficiencia de este proceso ya que el contenido biliar se solubiliza en los geles formados durante la digestión gástrica, afectando a la eficiencia de la bioaccesibilidad de carotenoides (Erdman y colaboradores, 1986; Rock y Swendseid, 1992; Jones y Ntanios, 1998; Westrate y Meijer, 1998). Se ha demostrado que la presencia en la dieta de sustitutos de las grasas como poliésteres de sacarosa reduce notablemente la bioaccesibilidad de carotenoides (Cooper y colaboradores, 1997). La ingesta de inhibidores de la lipasa pancreática, usados en el tratamiento de la obesidad, también disminuye la eficiencia del proceso de micelarización, produciendo un descenso de la concentración plasmática de carotenoides (Zhi y colaboradores, 1996; James y colaboradores, 1997).

Finalmente, la liposolubilidad del carotenoide es también un factor implicado en el proceso de micelarización. La liposolubilidad depende de las particularidades estructurales de cada carotenoide. La distinción general de carotenoides en carotenos y xantofilas supone una diferenciación en cuanto a su liposolubilidad. Los estudios comparativos de bioaccesibilidad indican una absorción preferente de xantofilas frente a carotenos. Así, la ingesta conjunta de carotenoides de uno y otro grupo evidencia una especie de competencia por la absorción en la que las xantofilas alcanzan una mejor bioaccesibilidad (Henderson y colaboradores, 1989; Fotouhi y colaboradores, 1996; Gartner y colaboradores, 1996). Por las determinaciones realizadas en estos estudios no se puede precisar en qué punto del proceso de absorción de carotenoides se produce la competencia. Es posible que en la fase de micelarización y debido a la diferente liposolubilidad, se produzca este efecto competitivo por la incorporación a micelas, pero también se podría producir en la posterior etapa de asimilación (van den Berg, 1999).

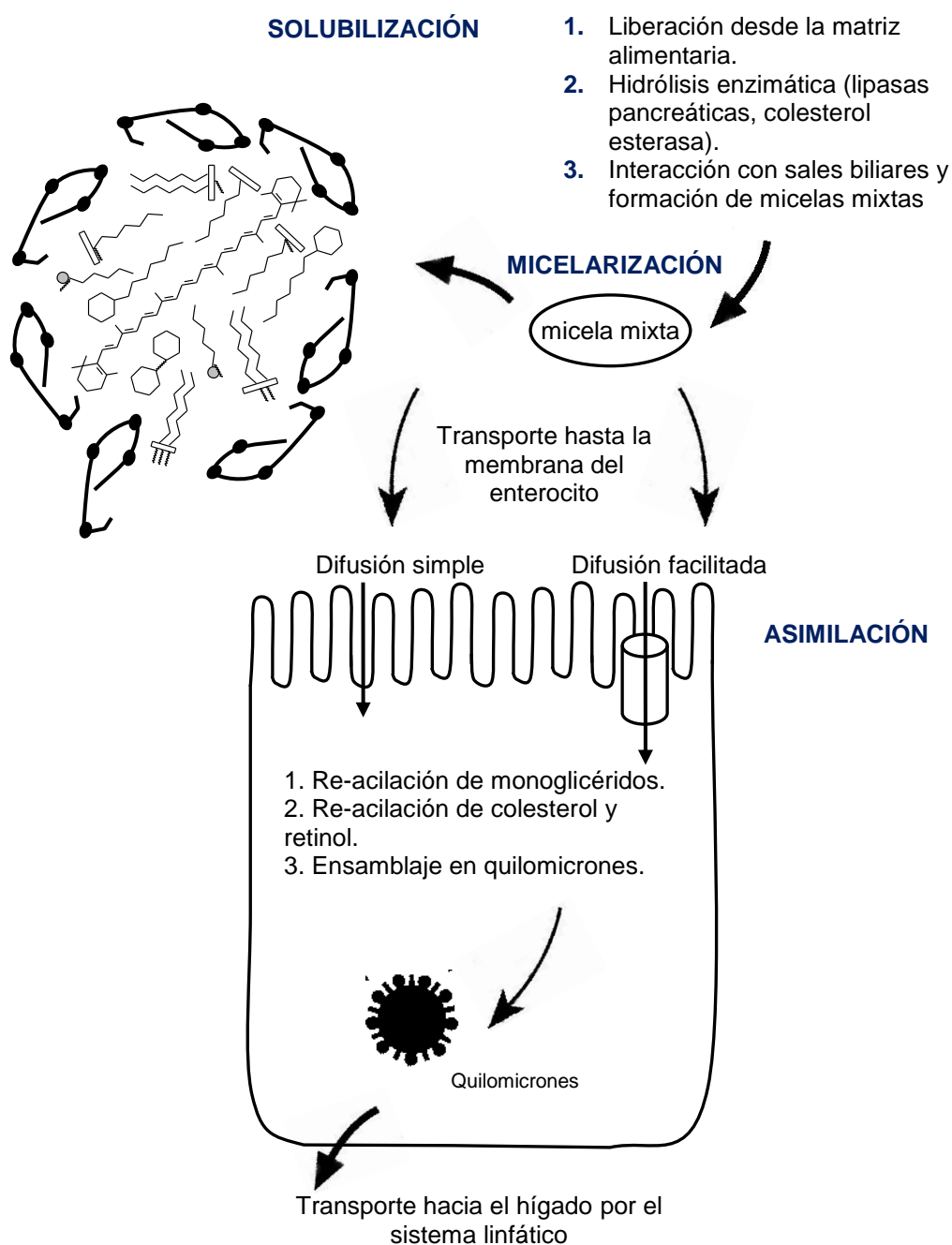


Figura 6.- Representación de las etapas de bioaccesibilidad (solubilización, micelarización y asimilación) de compuestos lipídicos en el epitelio intestinal.

Una particularidad estructural que puede alterar la liposolubilidad y, por tanto, la eficiencia de esta fase es la esterificación de xantofilas con ácidos grasos. Esta particularidad no ha sido considerada ampliamente en los estudios de bioaccesibilidad aunque las xantofilas que ingerimos estén habitualmente esterificadas. Este hecho va a aumentar la liposolubilidad en comparación con la correspondiente xantofila libre e incluso con carotenos, lo que puede disminuir la eficiencia del proceso de micelarización como se ha sugerido en algunos estudios post-prandiales (Roodenburg y colaboradores, 2000; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2003). Pero además, en los estudios de bioaccesibilidad carotenoide tras la ingesta de alimentos ricos en ésteres, sólo se detectan en plasma las correspondientes formas libres, lo que implica que en algún punto del proceso de absorción se ha producido su desesterificación, y lo lógico es asumir que esta reacción se ha realizado por la acción de las lipasas pancreáticas, durante la fase de micelarización (Olson, 1984; Khachik y colaboradores, 1992). De entrada, estas dos particularidades (mayor liposolubilidad y proceso de desesterificación) aumentan los requerimientos de sales biliares y enzimas digestivas para garantizar la asimilación de ésteres de xantofilas. De hecho los estudios de bioaccesibilidad realizados indican que los requerimientos de ingesta de grasa para alcanzar una eficiencia de absorción de ésteres de xantofilas similar a la de sus correspondientes formas libres son superiores (Roodenburg y colaboradores, 2000; Bowen y colaboradores 2002, Aman y colaboradores, 2004).

Mención especial merece la cuestión sobre qué enzima es la responsable de realizar el proceso de desesterificación. Se ha expresado que las lipasas pancreáticas podrían realizar de forma eficiente la hidrólisis de los ésteres y convertirlos a las correspondientes formas libres. Sin embargo, Breithaupt y colaboradores (2002b) demostraron que la lipasa pancreática humana (EC 3.1.1.3) no hidroliza de forma eficiente a los ésteres de xantofilas como β -criptoxanteno, zeaxanteno, luteína, y capsanteno, mientras que la lipasa pancreática porcina y la lipasa de *Candida rugosa* sí mostraron actividad sobre dichos ésteres. Puede parecer difícil asumir que la lipasa pancreática humana no presente actividad sobre los ésteres de xantofilas pero también se ha demostrado esta falta de actividad sobre otros sustratos (Rigtrup y colaboradores, 1994). En el estudio también se incluyó a la enzima carboxil-éster lipasa (EC 3.1.1.13, denominada colesterol esterasa en el trabajo), que presentó la mayor eficiencia. Esta

enzima es una lipasa no específica, cuya actividad depende de la presencia de sales biliares, e hidroliza ésteres de colesterol, tri- di- y mono-acilglicéridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos y ceramida (Hui y Howles, 2002). El rol de esta enzima es compensar o suplir la actividad hidrolítica de otras lipasas sobre esos sustratos (Harrison, 1998) e incluso se ha sugerido que su actividad está implicada directamente en la hidrólisis de ésteres de vitamina A (Rudd y Brockman, 1984; Rigtrup y colaboradores, 1994).

Si la enzima responsable de la hidrólisis de ésteres de carotenoides es la carboxil-éster lipasa habría que realizar una consideración importante, referida a la zona donde se localiza la actividad de esta enzima. Existen evidencias de que es en la membrana de las células del epitelio intestinal donde se desarrolla su actividad (Gallo y colaboradores, 1977; Lechene De la Porte y colaboradores, 1987). Consecuentemente sólo el material lipídico que es finamente emulsionado y micelarizado y que, por tanto, llega a la membrana de las células epiteliales es susceptible de ser hidrolizado por esta enzima. En el caso concreto de los ésteres de carotenoides, aunque se haya demostrado que son sustratos para la carboxil-éster lipasa no se ha probado que las formas esterificadas se incorporen de forma eficiente a las micelas, hecho necesario para que puedan alcanzar la membrana de los enterocitos donde entonces serán hidrolizados.

Asimilación

La etapa de asimilación culmina el proceso de absorción carotenoide, implicando el contacto entre el material asimilable de las micelas y los enterocitos del epitelio intestinal, tejido que actúa como filtro selectivo de nutrientes. El conocimiento sobre los eventos que tienen lugar en esta etapa se ha ampliado sustancialmente en los últimos años, demostrando la existencia de mecanismos de absorción diferentes a los considerados inicialmente. Se suponía que la asimilación del contenido lipídico micelar, incluidos los carotenoides, ocurría mediante un proceso de difusión pasiva en el que las micelas colisionaban con la membrana celular y difundían su contenido hacia el citosol de la célula (El-Gorab y colaboradores, 1975; Hollander y Ruble, 1978). Parker (1996) sugería que el gradiente de concentración entre el contenido micelar y el celular determinaba la velocidad de difusión, e incluso explicaba cómo a partir de una determinada concentración micelar carotenoide se podría saturar la asimilación, al

reducirse el gradiente de concentración. Sin embargo, los estudios realizados por Hauser y colaboradores (1980) han modificado sustancialmente la teoría sobre el mecanismo de absorción de colesterol, carotenoides y otros compuestos lipídicos. El perfil biocinético de absorción, obtenido con sistemas modelo como vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC) y cultivos de células del epitelio intestinal (Caco-2), muestra las características de una difusión facilitada (Thurnhofer y Hauser, 1990; Compassi y colaboradores, 1997). De esta forma, se ha identificado a los receptores SR-BI y CD36, como implicados en la absorción de colesterol y carotenoides, aunque esta asignación es todavía tema de debate e investigación (van Bennekum y colaboradores, 2005).

La identificación de estos receptores y el propio mecanismo de absorción están sustentados en el hallazgo de macromoléculas como α - y β -péptidos o ezetimiba que inhiben la absorción de compuestos lipídicos (Boffelli y colaboradores, 1997; Altmann y colaboradores, 2002). El mecanismo, además, es consistente con la significativa variabilidad sobre la eficiencia de absorción de lípidos como el colesterol entre individuos de una misma población lo que se atribuye a diferencias genéticas expresadas en el epitelio intestinal (Wang y colaboradores, 2001), hecho que también se ha observado en estudios de absorción post-prandial de carotenoides (Paetau y colaboradores, 1997; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2005). Sin lugar a dudas, la consecución de estos recientes logros se debe en gran medida al desarrollo de modelos de absorción *in vitro*, basados en la obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo, o cultivos celulares, que se han utilizado como herramienta analítica para el diseño de experimentos encaminados a la determinación de la biocinética de absorción de lípidos en general y de los carotenoides en particular (Wilson, 1990). El establecimiento de este mecanismo abrió la puerta al desarrollo de fármacos específicos que inhiben la actividad de las proteínas que facilitan la absorción de lípidos como colesterol a aquellos grupos de población afectados por trastornos en la bio-síntesis y/o absorción del mismo. Como nota curiosa, y en relación con ello, el investigador responsable de estos descubrimientos (Helmut Hauser) creó una empresa *spin-off* (llamada Lipideon Biotechnology AG) que se dedica al desarrollo de esos fármacos.

Una vez que el material lipídico es interiorizado por las células, se empaqueta en lipo-proteínas denominadas quilomicrones. Estos agregados moleculares que se ensamblan en el aparato de Golgi, alcanzan un tamaño de 75 a 1200 nm y se caracterizan por contener a la apoproteína B-48, imprescindible para el ensamblaje de estas partículas. Los quilomicrones se excretan al sistema linfático y posteriormente se dirigen al hígado degradándose antes de llegar a dicho órgano, por la actividad de la lipo-proteína lipasa, en partículas remanentes de quilomicrones, proceso que implica la liberación de parte del contenido lipídico de estas partículas y su absorción en tejido endotelial. Pero la mayor parte logra alcanzar el hígado donde se almacenan o re-excretan al sistema circulatorio empaquetados en lipo-proteínas de muy baja densidad que, durante su circulación, se transforman en LDL y finalmente en lipo-proteínas de alta densidad (HDL). Los carotenoides apolares como β -caroteno y licopeno, al estar concentrados en el corazón de las partículas lipo-proteicas experimentan un menor intercambio con otras lipo-proteínas por lo que las LDL aumentan su contenido carotenoides apolar, mientras que las HDL albergan mayoritariamente las xantofilas, de carácter más polar (Paetau y colaboradores, 1998). Esta cuestión es relevante puesto que va a marcar el depósito preferente de carotenos o xantofilas en determinados tejidos, en función de su densidad de receptores para LDL o HDL (Schmitz y colaboradores, 1991; Handelman y colaboradores, 1992).

Bioaccesibilidad de carotenoides desde matrices hidrofílicas

La bioaccesibilidad de carotenoides es, como se ha comentado previamente, limitada y está condicionada por diferentes factores, principalmente el grado de procesado del alimento y la composición de la matriz (Deming y Erdman, 1999). La grasa (tipo y cantidad) es un factor relevante, requerido en unas proporciones mínimas para asegurar la bioaccesibilidad. Sin embargo, se ha demostrado que la bioaccesibilidad de carotenoides desde alimentos grasos no es tan elevada como se podría esperar, como por ejemplo en el caso de concentrados oleosos como la oleorresina de tomate y pimiento, si se compara con la bioaccesibilidad que proporcionan matrices hidrofílicas elaboradas a partir de esos frutos (Oshima y colaboradores, 1997; Richelle, 2002; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2003). ¿Se podrían considerar las matrices hidrofílicas como una alternativa a las formulaciones oleosas para incrementar la

bioaccesibilidad de carotenoides? La formulación de compuestos lipofílicos en una matriz hidrofílica requiere de una técnica de solubilización adecuada (emulsión, encapsulación...), pero de esta forma se conseguiría diversificar las fuentes tradicionales de estos compuestos bioactivos. En este sentido la aplicación de cualquiera de las técnicas apropiadas podría ser una estrategia adecuada para conseguir diferentes objetivos, no sólo la estabilidad de los compuestos bioactivos, sino también su digestibilidad/asimilación. Con este objetivo se han desarrollado formulaciones líquidas en las que los carotenoides se han incorporado en forma de emulsiones aceite en agua (O/W) (Spernath y colaboradores, 2002; Amar y colaboradores, 2003) con la idea de que una buena incorporación o emulsión de carotenoides en un entorno hidrofílico incrementaría la bioaccesibilidad, aunque la estimación de este parámetro nunca se ha determinado en estas formulaciones. Sólo si durante el proceso de optimización de la formulación se incorpora la estimación de la digestibilidad/asimilación como criterio de diseño, se conseguirá completar las cualidades o propiedades de la formulación desde una perspectiva más amplia.

Modelos de digestión *in vitro*

La información sobre la bioaccesibilidad de carotenoides obtenida en las últimas décadas se ha logrado por la aplicación de estudios de absorción post-prandiales y de suplementación. Esta aproximación, si bien ha resultado muy valiosa, no permite realizar análisis en detalle del efecto de la composición de la matriz alimentaria y de otros factores implicados en la absorción de carotenoides, en cada una de las etapas en las que, según se ha desarrollado anteriormente, se divide el proceso de absorción de estos compuestos lipofílicos (bioaccesibilidad). Pero además de proporcionar una información no exhaustiva, se trata de procedimientos caros y al utilizar modelos de experimentación animal o humano se requiere obligatoriamente el cumplimiento de una serie de normas éticas y de bioseguridad. ¿Por qué no se recurría a modelos de experimentación *in vitro*? Sí existían modelos de digestión *in vitro* que se habían puesto a punto para la estimación de la digestibilidad de minerales como hierro y fósforo (Miller y colaboradores, 1981; Liu y colaboradores, 1998), colesterol (Fouad y colaboradores, 1991) y vitaminas hidrosolubles (Ekanayake y Nelson, 1986), pero estos modelos no resultaban completamente aplicables al estudio de la digestibilidad de compuestos

liposolubles ya que no incluían una etapa de separación de la fracción micelar, donde se aloja todo el material lipídico que es potencialmente asimilable. Se trata de modelos gastrointestinales estáticos que simulan el tránsito a través del tracto digestivo humano, reproduciendo las condiciones fisiológicas de la digestión gástrica e intestinal. Son modelos simples, fáciles de aplicar a un amplio número de muestras y que permiten estimar el efecto, tanto de las condiciones de digestión como de otros factores ligados a la matriz alimentaria, en la bioaccesibilidad (digestibilidad y asimilación) de un nutriente.

El procedimiento consiste en someter al alimento al proceso digestivo, dividido en dos etapas, gástrica e intestinal, cuyas condiciones estándar podrían ser las que se exponen a continuación que se basan en el trabajo de Miller y colaboradores (1981). En la fase gástrica, una porción del alimento homogeneizado se acidifica a pH 2 con HCl 1 M y se añade una suspensión de pepsina porcina. El homogeneizado se transfiere a un tubo de ensayo y se incuba en un baño termostatzado a 37 °C con agitación circular. A continuación, y para efectuar la fase intestinal, el pH se eleva hasta 5,3 mediante la adición de bicarbonato sódico, junto con una suspensión de pancreatina y extracto biliar en solución de bicarbonato sódico. Nuevamente se eleva el pH, ahora hasta 7,5, y la mezcla se incuba durante 2 horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores. Cuando el procedimiento de digestión se aplicaba al objeto de estimar la digestibilidad de un nutriente hidrosoluble no era necesario aislar el contenido micelarizado del resto del alimento no digerido o que había sido parcialmente emulsionado, separación imprescindible si se pretende analizar la digestibilidad y/o asimilación de material liposoluble, procedimiento que no se puso a punto hasta 1990. En el trabajo de Hernell y colaboradores (1990) se estudiaron pormenorizadamente las propiedades físico-químicas del contenido duodenal durante la digestión de una comida rica en triglicéridos, ingerida por los voluntarios que participaron en el ensayo de los que, por aspiración, se tomó el contenido duodenal para su análisis. La aplicación de un proceso de ultracentrifugación permitió separar las distintas fracciones, triglicéridos no digeridos, fracción micelar y un precipitado, tal y como se representa en la Figura 7. La conjunción de un modelo de digestión *in vitro* con el método de separación de la fracción micelar por ultracentrifugación sí implica una herramienta experimental completa con la que se pueden realizar estimaciones de la

digestibilidad de componentes liposolubles ya que se logra separar el contenido lipídico micelar, que es el susceptible de ser asimilado por las células del tejido epitelial.

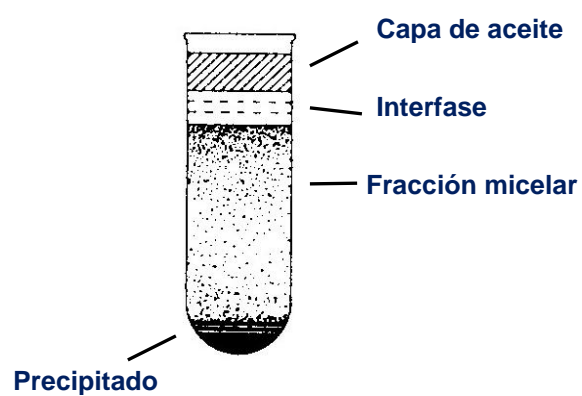


Figura 7.- Fracciones obtenidas tras la aplicación del proceso de ultracentrifugación descrito por Hernell y colaboradores (1990) a un digestato.

Las condiciones experimentales de cualquier modelo de digestión no se alejarán demasiado de las comentadas anteriormente, ya que se trata de reproducir las etapas y condiciones fisiológicas del proceso digestivo humano. Sí es posible encontrar adaptaciones del modelo anterior, pero se trata de cambios o modificaciones puntuales del modelo básico expuesto, en función del problema o aplicación que se pretende desarrollar. Y es que los modelos de digestión *in vitro* tienen múltiples aplicaciones y pueden aportar conocimientos en áreas que incluyen desde el análisis de aspectos toxicológicos de posibles contaminantes en los alimentos (Oomen y colaboradores, 2003), el estudio de factores de la dieta que intervienen en la bioaccesibilidad de un nutriente o componente determinado, el efecto que las condiciones hepato-biliares diferentes o no habituales tienen en la bioaccesibilidad de compuestos lipídicos (Leo y colaboradores, 1995) hasta el diseño de matrices alimentarias en las que el concepto de bioaccesibilidad es un criterio de selección de componentes de la matriz de igual importancia que otros como la estructura física, la estabilidad o la palatabilidad (Manzocco y Nicoli, 2002). En el contexto de los alimentos funcionales el concepto de bioaccesibilidad es un criterio a considerar en el diseño de este tipo de alimentos ya que cualquier alegación de beneficio para la salud que se establezca por la ingesta de un alimento funcional no resulta válida si no se certifica que el componente bioactivo se absorbe de forma eficiente (Aggett y colaboradores, 2005). Por ello, los modelos de digestión *in vitro* constituyen una herramienta analítica eficaz con la que avalar la digestibilidad del compuesto bioactivo desde diferentes matrices, y son punto de partida para posteriormente analizar la asimilación sin recurrir a modelos de experimentación *in vivo*.

En el caso particular de pigmentos carotenoides, se ha aplicado la digestión *in vitro* para la estimación de la digestibilidad de estos compuestos desde los alimentos naturales que los contienen. El trabajo de Garrett y colaboradores (1999) constituye la primera aplicación de un modelo de digestión *in vitro* en combinación con un modelo de asimilación intestinal basado en la línea celular Caco-2, para determinar la bioaccesibilidad de carotenoides en alimentos. El procedimiento experimental sigue las etapas comentadas anteriormente, una fase gástrica, una fase intestinal y la separación de la fracción micelar. En el estudio se emplearon alimentos infantiles elaborados a base de frutas y verduras, y pasta de tomate, analizando diversos

factores que controlan el proceso digestivo. Así, se determinó que la omisión de la fase de digestión gástrica no modifica la eficiencia del proceso de micelarización obtenida en la fase de digestión intestinal y se concretaron las cantidades de sales biliares y suspensión de enzimas pancreáticas que proporcionan la mejor transferencia de carotenoides desde el alimento a las micelas, concluyendo que las cantidades adecuadas se corresponden con las concentraciones fisiológicas estimadas en estudios anteriores (Tso, 1994; Charman y colaboradores, 1997).

Posteriormente, el método desarrollado por Garrett y colaboradores se ha aplicado y adaptado en otros estudios de digestibilidad y/o asimilación de carotenoides con ligeras modificaciones. En el trabajo de Hedrén y colaboradores (2002) se estudió la digestibilidad de carotenos en zanahorias, frescas o cocinadas, aplicando condiciones similares al método de Garrett en cuanto a concentración de enzimas digestivas y sales biliares, y manteniendo los tiempos de incubación, pero modificando las condiciones de separación de la fracción micelar. En los trabajos publicados por Breithaupt y colaboradores (2002b), y Zorn y colaboradores (2003) se elimina la fase de digestión gástrica y se sustituye el pool enzimático de pancreatina por lipasa pancreática y carboxil-éster lipasa que parece tener un efecto positivo en la micelarización y posterior proceso de asimilación de carotenoides (Chitchumroonchokchai y Failla, 2006). La incorporación de la enzima carboxil-éster lipasa junto con la lipasa pancreática en la fase de digestión intestinal es la principal modificación al método de Garrett y colaboradores, introducida en otros estudios como el de Granado-Lorencio y colaboradores (2007). En este último trabajo se aplica, antes de las dos fases de digestión (gástrica e intestinal), una primera etapa de simulación de la masticación incorporando una solución salivar con componentes orgánicos e inorgánicos, y α -amilasa (EC 3.2.1.1).

Modelos de asimilación *in vitro*

Considerando las características de los procesos que tienen lugar en las etapas de digestibilidad y asimilación, quizás sea esta última la más compleja de reproducir con modelos *in vitro*. Además de considerar los procesos fisio-químicos que, como en la etapa de digestibilidad, ocurren durante la asimilación hay que incluir los eventos de carácter bioquímico para lograr reproducir la absorción intestinal. La mucosa intestinal no sólo es una barrera que actúa como filtro físico, sino una barrera bioquímica en la que tienen lugar procesos

metabólicos que forman parte del metabolismo presistémico, además del transporte de nutrientes y compuestos bioactivos mediante difusión simple, facilitada o transporte activo. Sin embargo, a pesar de la complejidad real, existen numerosas alternativas para reproducir el proceso de asimilación intestinal. Así, y antes de describir los modelos de asimilación *in vitro*, mencionar que existen técnicas *ex vivo*, (Ungell, 2002) *in situ* (Schanker y colaboradores, 1958) y, lógicamente, *in vivo* (Poelma y Tukker, 1987).

Se diferencian varios tipos de modelos *in vitro*, principalmente aquellos basados en la reproducción física de la membrana, los basados en cultivos celulares, y aquellos que utilizan membranas celulares, siendo los dos últimos los que se aproximan más a una situación *in vivo*. Los primeros, modelos basados en membranas artificiales, tienen como objetivo la medida de una propiedad física del nutriente o compuesto bioactivo: su permeabilidad a través de la membrana, siguiendo la metodología de Kansy y colaboradores (1998), desarrollada en los laboratorios de Hoffmann-La Roche. La membrana se reproduce artificialmente integrando fosfolípidos y otros constituyentes de la membrana en una solución con disolvente orgánico. Esta solución se coloca en un filtro poroso que le proporciona el sustento físico sobre la disolución búfer donante y bajo la disolución búfer receptora. Este modelo tipo sándwich se representa en la Figura 8. El caballo de batalla de los modelos tipo membrana está en la composición lipídica de la membrana artificial que se coloca sobre el filtro que debe reproducir, en la medida de lo posible, la composición de la membrana de las células del epitelio intestinal. En este sentido es donde más modificaciones se han introducido para optimizar el modelo. Desde la composición original descrita por Kansy y colaboradores a las modificaciones realizadas por Sugano y colaboradores (2001) o por Avdeef y colaboradores (2004) todas las mejoras han conseguido que los modelos de permeabilidad en membrana reproduzcan los resultados obtenidos con otros modelos. Otra cuestión, recurrente en todos los modelos salvo los *in vivo* es intentar reproducir el dinamismo del lumen y del epitelio intestinal. El lector puede comprobar, tras visualizar la Figura 8, que las condiciones de estos modelos son esencialmente estáticas.

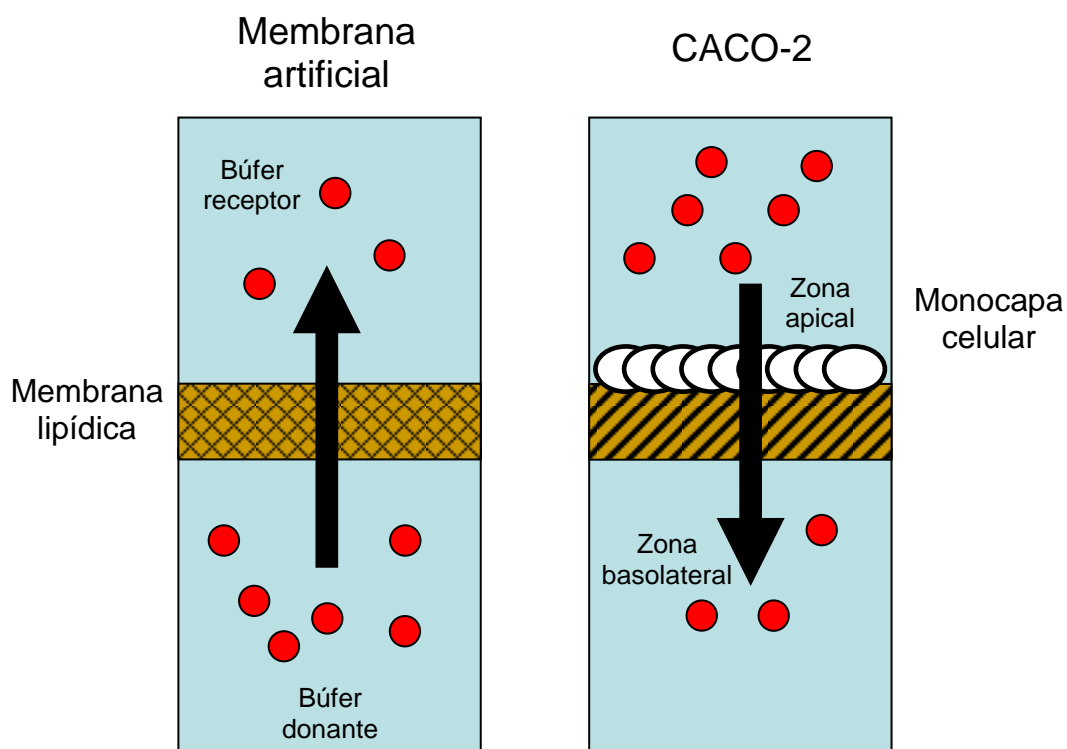


Figura 8.- Modelos para la estimación de la asimilación *in vitro* de nutrientes, componentes bioactivos y fármacos basados en la permeabilidad a través de membranas artificiales o en cultivos celulares.

No obstante y a pesar de las limitaciones, este tipo de modelos tiene grandes posibilidades de crecimiento, tanto, que en numerosas notas técnicas de empresas farmacéuticas de I+D se augura que llegará a desplazar a los modelos *in vitro* basados en cultivos celulares, teniendo en cuenta su menor coste y la más que aceptable correlación de los resultados con resultados *in vivo* (Kansy y colaboradores, 1998). Esta técnica es ideal como modelo de alta resolución (en inglés, high-throughput screening) para realizar el barrido experimental necesario en el estudio de productos en desarrollo (fármacos, compuestos fitoquímicos que presentan bioactividad).

Los modelos basados en cultivos celulares gozan de una elevada popularidad y están ampliamente implantados y aceptados por la comunidad científica como referentes válidos para estimar la asimilación de nutrientes y compuestos bioactivos. Puesto que los cultivos primarios de enterocitos procedentes de explantes de tejido epitelial no forman una monocapa epitelial, y por tanto no presentan zona apical y basolateral, es necesario recurrir a líneas celulares generalmente procedentes de tumores que sí conforman las características estructurales de una monocapa celular. El modelo se representa en la Figura 8. La monocapa de células se cultiva sobre un filtro soporte colocando en la zona apical la solución búfer donante y bajo la zona basolateral la solución búfer receptora. Se han descrito distintas líneas celulares como la MDCK (células procedentes de riñón de perro, Madin-Darby Canine Kidney), 2/4/A1 (células intestinales procedentes de intestino de fetos de rata), LLC-PK1 (células procedentes de epitelio de riñón de cerdo) y la más conocida, Caco-2. Dicha línea celular procede de colonocitos humanos procedentes de un adenocarcinoma y, cultivados en condiciones adecuadas, presentan las características morfológicas de los enterocitos así como una amplia mayoría de enzimas y proteínas de membrana (Jumarie y Malo, 1991). Con esta línea celular se ha caracterizado el transporte activo de glucosa, péptidos, aminoácidos, ácidos biliares, carotenoides, etcétera (Delie y Rubas, 1997; Garret y colaboradores, 1999; Bleasby y colaboradores, 2000; Manach y Donovan, 2004). La miniaturización, el desarrollo de soluciones búfer de carácter fisiológico y la estandarización con sustancias patrón referentes para contrastar resultados interlaboratorios son las mejoras que se están introduciendo para aproximar estos modelos a situaciones *in vivo* (Ingels y Augustijns, 2003). Como en los

modelos basados en membranas artificiales, los modelos basados en cultivos celulares también son excesivamente estáticos lo cual estará sujeto a sucesivas mejoras. También se trabaja en lograr que las células lleguen a expresar convenientemente la pléyade de transportadores proteicos que habitualmente se encuentran en los enterocitos del epitelio intestinal. No hay que olvidar que esta línea procede de colon, no de intestino delgado, lo que supone un handicap en la expresión del número adecuado de transportadores (superior en intestino delgado que en colon). Para mejorar este aspecto se han desarrollado clones de la línea Caco-2, como la TC7 (Carriere y colaboradores, 1994).

Al igual que los modelos de membrana, los modelos de asimilación *in vitro* basados en cultivos celulares constituyen una técnica de barrido experimental de alta resolución (high-throughput screening) ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para estimar la asimilación de fármacos, siendo posible, con la instrumentación adecuada, realizar cientos de experimentos simultáneamente. Este modelo también presenta una excelente correlación con los resultados de estudios *in vivo* (Verma y colaboradores, 2007).

En un punto intermedio entre los dos modelos anteriores, se encuentran las preparaciones de vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC), que constituyen el método clásico para estudios mecanísticos del transporte de nutrientes, compuestos bioactivos, o fármacos a través de la membrana celular. Las vesículas, membranas celulares en suspensión, actúan como receptoras ya que conservan los transportadores proteicos y enzimas de membrana con los que interaccionan con los nutrientes procedentes de la solución donante con la que se ponen en contacto. Las vesículas se obtienen aislando células de la mucosa intestinal, mediante su raspado o por vibración y sometiénolas a un proceso de eliminación de los restos de tejido y de membrana basolateral. El concentrado purificado de células de la mucosa, se fracciona mediante centrifugación y precipitación, en vesículas de membrana de borde en cepillo separadas de la fracción nuclear y mitocondrial. Esta técnica, descrita en 1961 por Miller y Crane experimentó ligeras modificaciones en cuanto al procedimiento experimental, que lograron incrementar la pureza, estabilidad y rendimiento de la preparación, pero a partir de entonces, la técnica ha permanecido bastante inalterada. La preparación en búfer isotónico de VMBC se incubaba con la solución o suspensión donante que contiene los nutrientes objeto de

estudio, y una vez finalizado el ensayo se filtra o centrifuga, para separar la fracción de VMBC de la solución búfer y donante pudiendo analizar el contenido en nutriente tanto en dicha fracción de VMBC como en búfer para completar el balance de materia. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en estudios mecanísticos de asimilación de nutrientes como glucosa, sales biliares, lípidos, xenobióticos, colesterol y carotenoides (Hopfer y colaboradores, 1973; Kessler y colaboradores, 1978; Proulx y colaboradores, 1982; Burckhardt y colaboradores, 1983; Ikeda y colaboradores, 1988; Ling y colaboradores, 1989; Alcorn y colaboradores, 1991; Keelan y colaboradores, 1992; Moore y colaboradores, 1996; y referencias adicionales en el apartado dedicado a la asimilación de carotenoides, página 43). En esos estudios se utilizó tejido intestinal de diversas especies animales como cerdo, conejo, gallina, rata, ratón, y también de humanos, aunque lógicamente éstos son menos frecuentes debido a la escasa disponibilidad de tejido que reúna las condiciones necesarias para los ensayos. También este modelo presenta limitaciones, fundamentalmente porque sólo es predictivo para una parte del proceso de absorción, la que ocurre hacia el interior de la membrana. Las vesículas se encuentran en suspensión por lo que se aplican condiciones dinámicas en el ensayo, pero ello impide que se diferencie una zona basolateral, que represente el transporte a través de la membrana.

Como se puede apreciar, existe un amplio abanico de modelos experimentales que permiten obtener información de la eficiencia de cada etapa del proceso digestivo así como de los mecanismos implicados en cada proceso. Cada uno de estos modelos coloca el foco de observación en un aspecto concreto (eficiencia de digeribilidad o de asimilación, modificaciones estructurales debidas al proceso digestivo o al metabolismo intestinal, mecanismos implicados en la asimilación o la inhibición de la misma...) permitiendo obtener información más relevante acerca del mismo. Es el experimentador el que decide qué aspecto pretende conocer en detalle para después integrarlo en el conocimiento más general que se obtenga del proceso de bioaccesibilidad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. *Determinar la significación de los factores cantidad de aceite en la matriz, tipo y mezcla de carotenoides y cantidad de colesterol en la matriz en la digestibilidad de carotenoides.*

El desarrollo experimental de modelos de digestión *in vitro* permite analizar con detalle los factores implicados en la etapa de digestibilidad de componentes lipídicos, y que están relacionados con la constitución de la matriz alimentaria en la que se integran esos componentes. Los factores considerados en este objetivo están relacionados con el entorno lipídico que compone la matriz y que va a formar parte del contenido micelar, por lo que son factores que pueden actuar como coadyuvantes o interferentes del proceso de micelarización. De esta forma, una mayor cantidad de materia grasa en la matriz puede cooperar en el proceso de micelarización aunque este factor podría afectar de forma diferente a cada carotenoide en función de su polaridad, factor también implicado en la eficiencia del proceso de micelarización. Así, la competencia entre carotenoides de diferente polaridad se considera como factor a tener en cuenta en este proceso determinando su importancia en esta etapa. Finalmente, el tercer factor incluido en el estudio, la cantidad de colesterol en la matriz tiene por objeto completar la perspectiva actual que se tiene sobre el proceso conjunto de asimilación de carotenoides y colesterol, con un análisis de la participación de colesterol en el proceso de digestibilidad de carotenoides.

2. *Selección y optimización de la composición de una emulsión O/W que maximice la digestibilidad de carotenoides.*

La transferencia de compuestos lipofílicos a una matriz hidrofílica mediante la participación de emulgentes que dispersen finamente el contenido lipídico es una estrategia adecuada para incrementar la digestibilidad de lípidos bioactivos como los carotenoides, haciendo posible su inclusión en otro tipo de alimentos que reúnan características atractivas para el consumidor. La distinción de los componentes de la emulsión que aportan sinergias de aquellos que muestran antagonismos en la respuesta se realizará mediante la aplicación de un modelo de digestión *in vitro* como herramienta analítica con la que examinar la eficiencia de la digestibilidad. Considerando el amplio número de emulgentes que participan en este objetivo,

el uso del diseño experimental es imprescindible para alcanzarlo habiendo realizado el adecuado número de experimentos y optimizado los recursos disponibles.

3. Inhibición del transporte de carotenoides.

Como se ha comentado anteriormente, el conocimiento actual sobre los eventos que tienen lugar en la etapa de asimilación se ha ampliado sustancialmente en los últimos años, modificando la teoría existente sobre el mecanismo de absorción de colesterol, carotenoides y otros compuestos lipídicos. Se suponía que la asimilación del contenido lipídico micelar, incluidos los carotenoides, ocurría mediante un proceso de difusión pasiva. Sin embargo, el perfil biocinético de absorción, obtenido con sistemas modelo muestra las características de una difusión facilitada. Focalizando la observación sobre los eventos que tienen lugar durante la asimilación, se analizará el efecto inhibitor que las apolipoproteínas tienen sobre la absorción de carotenoides, empleando como sistema modelo de absorción *in vitro* las vesículas de membrana de borde en cepillo. Con la inhibición se busca reproducir situaciones de baja asimilación intestinal como las que ocurren en individuos que presentan una baja densidad de transportadores residuales, inflamación intestinal crónica o un estatus oxidativo del epitelio que modifique la necesidad de incorporar antioxidantes liposolubles. Si existe efecto de inhibición se estudiará si un cambio en el entorno molecular de los carotenoides, mediante su integración en complejos de inclusión permite modificar sustancialmente el proceso de inhibición del transporte.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

Extractos vegetales concentrados en carotenoides

Para la realización de los experimentos de micelarización de carotenoides a partir de una matriz lipofílica, se utilizaron aquellos extractos oleosos concentrados en carotenoides, obtenidos de la fuente vegetal apropiada. El extracto oleoso de licopeno, obtenido a partir de un concentrado de tomate (*Lycopersicon esculentum*) fue suministrado por Lycored (Beer-Sheva, Israel) y se utilizó como fuente de licopeno. El extracto oleoso de luteína, obtenido a partir de un concentrado de pétalos de marigold (*Tagetes erecta*) fue suministrado por Kemin Foods (Des Moines, Iowa, EEUU). En este caso se dispone de dos formatos, el extracto oleoso directo que contiene luteína esterificada y el extracto oleoso saponificado, que se utiliza como fuente de luteína libre. Se dispone de un extracto oleoso de β -caroteno, suministrado por Extractos Vegetales S. A. (La Línea de la Concepción, Cádiz, España), obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) y un extracto oleoso de carotenoides del pimiento (*Capsicum annuum* L.) también suministrado por Extractos Vegetales S. A. (La Línea de la Concepción, Cádiz, España). Como fuente de aceite vegetal para modificar el entorno lipofílico en el que se desarrolla la digestión se utilizó un aceite de girasol refinado comercial, libre de carotenoides. Estos extractos oleosos se utilizaron como fuente de carotenoides para, tras una etapa de purificación (como se detallará en los apartados correspondientes), la elaboración de complejos de inclusión.

Emulgentes

Para la realización de los experimentos de micelarización de carotenoides a partir de emulsiones, se empleó un grupo de compuestos emulgentes seleccionados entre diferentes productos diseñados para emulsionar sustancias oleosas y mejorar su bioaccesibilidad. Los productos utilizados fueron suministrados por la empresa Gattefossé (Gennevilliers, Francia) y se detallan a continuación:

Diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-1); mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2); monopalmitato de sacarosa, CAS: 26446-38-8 (EMF-3); 2,3-dihidroxipropil-docosanoato, CAS: 30233-64-8 (EMF-4); gliceril-palmito-estearato, CAS:

8067-32-1 (EMF-5); poligliceril-oleato, CAS: 76009-37-5 (EMF-6); propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7); gliceril-monoestearato, CAS: 31566-31-1 (EMF-8); hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0 (EMF-9). Todos estos productos están comercialmente disponibles y tienen la calificación GRAS.

Mantequillas y margarinas

El modelo de digestión *in vitro* se aplicó a diferentes materias grasas para untar adquiridas en supermercados locales. Su composición nutricional aparece indicada en la Tabla 4.

Tabla 4.- Composición media por cada 100 gramos de producto en las materias grasas para untar utilizadas en el estudio.

	Declarado por el fabricante			
	Grasa (g)	Esteroles (g)	Fibra (g)	ER (μg)
M1	32	8	- ¹	800
M2²	35	7,5	-	800
M3²	41	-	2	-
M4²	40	-	-	560
M5²	41	-	-	275
M6	55	-	-	600
M7²	60	-	-	800
M8	73	-	-	751

¹ Ausente.

² En la etiqueta del producto consta el uso de β-caroteno como colorante añadido.

Reactivos y disolventes

Acetona, metanol, hexano, etanol absoluto, cloruro de metileno, y N,N-dimetilformamida de calidad HPLC de la marca Romyl, fueron suministrados por Teknokroma (Barcelona, España). El agua purificada se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EEUU). Extracto biliar, lipasa pancreática porcina (tipo II), con una actividad de 100-400 U/mg (actividad determinada usando aceite de oliva; 1 unidad hidroliza 1 microequivalente de ácido graso en 1 hora), pepsina, con una actividad de 800-2500 U/mg (actividad determinada usando hemoglobina como sustrato) y β -apo-8'-carotenal fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Colesterol fue suministrado por Panreac (Lyon, Francia). La β -ciclodextrina (98% de pureza) fue proporcionada por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Para la determinación de la actividad de lipasa pancreática se utilizó p-nitrofenilpalmitato y p-nitrofenol, adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) suministró un extracto enzimático de co-lipasa pancreática de cerdo, (98% de pureza), con una actividad de 97533 U/mg (actividad determinada usando tributirina; 1 unidad hidroliza 1 microequivalente de ácido graso en 1 hora). Para la determinación de la concentración de proteínas se empleó sal disódica del ácido 2,2'-biquinolina-4,4'-dicarboxílico proporcionada por Fluka (St. Louis, MO, EEUU) y seroalbúmina bovina pura suministrada por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Para la determinación de la actividad de sacarasa intestinal se utilizó glucosa (pureza $\geq 99,5\%$), glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (tipo VII), con una actividad de 180,2 U/mg sólido (actividad determinada usando glucosa como sustrato), peroxidasa de rábano (tipo II), con una actividad de 150-250 U/mg (actividad determinada usando pirogalol como sustrato), ácido-3-dimetil-aminobenzoico y 3-metil-2-benzotiazolinona, adquiridos todos ellos a Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Suero bovino y sal sódica de heparina procedente de mucosa intestinal de cerdo Grado I-A ≥ 140 unidades USP/mg, fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). El resto de reactivos y disolventes empleados fueron de calidad analítica.

Diseño experimental (1)

Definición y cálculo de la eficiencia de la micelarización (EM)

La estimación de la digestibilidad de un componente lipídico en una matriz alimentaria se corresponde con la cantidad de ese componente que se transfiere desde la matriz a la fracción micelar y es por tanto potencialmente asimilable por las células de la mucosa intestinal. La eficiencia de la micelarización proporciona elementos de causa con los que establecer si la composición de la matriz alimentaria es la más adecuada para favorecer la digestibilidad de un nutriente lipídico. En el presente estudio, conocida la cantidad de carotenoides presente en la mezcla a digerir, ya sea procedente de un extracto vegetal, de una mantequilla o margarina, o bien de un emulsionado, y conocida la cantidad de carotenoides que pasa a formar parte de la fracción micelar una vez aplicado el método de digestión *in vitro* se calcula la eficiencia de micelarización expresada en términos de porcentaje:

$$EM = \frac{\text{Cantidad carotenoide micelarizada} \times 100}{\text{Cantidad carotenoide en la matriz}}$$

Factores implicados en la micelarización de carotenoides en matrices lipofílicas

Para distinguir los factores que modulan significativamente los valores de EM, se realizaron, en primer lugar, los experimentos en condiciones estándar para obtener valores de EM de referencia que se contrastarán con los valores de EM obtenidos cuando se modifica la composición de la matriz a digerir. Se realizan tres grupos de experimentos para controlar los siguientes factores que pueden modificar los valores de EM de referencia: 1. Cantidad de aceite en la matriz. 2. Tipo y mezcla de carotenoides. 3. Cantidad de colesterol en la matriz.

En el primer conjunto de experimentos, se adiciona a la mezcla de digestión y al comienzo de la fase gástrica, una cantidad conocida de aceite vegetal. De esta forma se pretende analizar el factor cantidad de aceite en la matriz en la eficiencia de la micelarización. Este factor se estudia en dos niveles cuantitativos, añadiendo 100 o 300 μL de aceite vegetal.

El segundo grupo de experimentos consiste en partir de una mezcla de dos carotenoides, en lugar de aplicar el proceso digestivo a uno sólo. De esta forma se pretende determinar la influencia del factor tipo y mezcla de carotenoides que indique interacción o competencia por la micelarización, entre los carotenoides inicialmente presentes en la mezcla a digerir. Este factor se estudia en dos niveles cualitativos: mezcla licopeno-luteína; mezcla licopeno-ésteres de luteína. La relación cuantitativa en la mezcla se mantiene constante e igual a 1:1. En este conjunto de experimentos se introdujo un segundo nivel de complicación ya que se realizaron los experimentos sin la adición de aceite, o con la adición de 100 μL o 300 μL de aceite vegetal.

En el tercer grupo de experimentos se incluye colesterol como componente de la mezcla inicial a digerir. Se pretende analizar la influencia del factor cantidad de colesterol en la matriz en la eficiencia de la micelarización de carotenoides, contando con dos niveles: adición de 50 mg o de 150 mg de colesterol. Además este conjunto de experimentos se realiza sin adición de aceite o con la adición de 100 μL de aceite a cada uno de los niveles de colesterol y al comienzo de la etapa de preincubación. En este caso, y al tratarse de factores cuantitativos se aplicó la metodología de superficie respuesta para determinar la posible interacción entre los factores cantidad de aceite en la matriz y cantidad de colesterol en la matriz (Myers y

Montgomery, 1995). El diseño experimental de este grupo de determinaciones es *central composite* con dos variables o factores independientes (cantidad de aceite y cantidad de colesterol en la matriz) a dos niveles. El análisis de regresión de los datos obtenidos y la estimación de los coeficientes de la ecuación de regresión se realiza con el programa de diseño experimental Design Expert (versión 6.0.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EEUU, 2001). El ajuste del modelo de regresión obtenido se verifica mediante la determinación del coeficiente R^2 ajustado (R^2_{adj}). La significación estadística del modelo se determina mediante la aplicación del test de Fischer (F-test), fijando el nivel de significación de p en valores inferiores a 0,05.

Formulación de la matriz hidrofílica para maximizar la EM de carotenoides

En este caso, y para alcanzar el objetivo propuesto, se trata de resolver un problema de naturaleza factorial. El método de resolución de este tipo de problemas está bien descrito en la bibliografía científica existiendo reseñas de ejemplos y descripciones concretas (Aguilar y Rincón, 2007). El procedimiento que se seguiría es el siguiente: generalmente se parte de un gran número de factores a examinar, en este caso, los nueve emulgentes descritos en el apartado de materias primas, de los que habrá que identificar cuáles son factores críticos, es decir, aquellos que ejercen un efecto significativo en la variable respuesta que define a este objetivo, concretamente se trata de maximizar la EM. Como se está trabajando con mezclas de distintos componentes y en distintas proporciones se utilizará un diseño *simplex-lattice*, (SL) (Cornell, 2002a) para localizar qué factores son críticos en la respuesta considerada (EM). Con este procedimiento se conocerá, para cada factor, si su presencia en la emulsión tiene un efecto positivo o negativo en la respuesta (EM), seleccionando, evidentemente a aquellos factores (emulgentes) que sólo tengan un efecto positivo en la misma y descartando al resto. Una vez que se han detectado los factores críticos se procede, en una segunda fase de experimentación, a optimizar la composición, es decir, en qué proporción se deben mezclar los factores que se seleccionan en la primera fase, para maximizar la respuesta. En este caso se aplica un diseño experimental *simplex-centroide*, (SC). A continuación se describen en detalle, las dos etapas de experimentación y los diseños experimentales aplicados.

Fase de barrido experimental: detección de factores críticos

El objetivo de esta fase es identificar aquellos factores (emulgentes) que producen un efecto relevante en la respuesta, es decir, maximizan la eficiencia de micelarización del perfil carotenoide presente en la matriz hidrofílica. Para conseguir este objetivo, se aplica un diseño experimental SL aumentado (incluyendo puntos interiores y uno central) para 10 componentes (nueve emulgentes y agua) ya que la cantidad de carotenoides en la emulsión se mantiene constante (6 mg). Como restricciones en el diseño se incluyen: 1. La cantidad de agua mínima es del 80%. 2. La cantidad máxima de cada emulgente para elaborar la emulsión se limita al 5%. Estas restricciones se establecen en base a experimentos previos y a las recomendaciones que realiza el fabricante de los emulgentes. Así, para la preparación de 10 gramos de emulsión aceite en agua se utilizan 6 mg de carotenoides, un mínimo de 8 gramos de agua y el resto, hasta los 10 gramos, se completa según cada una de las 65 mezclas prototipo que proporciona el diseño experimental y que se representan en la Tabla 5.

Optimización de la mezcla de factores críticos

De acuerdo con los resultados que se obtengan en la fase de barrido experimental se escogerán aquellos factores (emulgentes) que *a priori* producen una mayor eficiencia en la micelarización de carotenoides desde la emulsión y se aplicará un diseño experimental SC. Las características del diseño y otros detalles forman parte de los resultados y discusión del presente trabajo. Sí cabe mencionar en este punto que en ambas fases, se aplicó la metodología de superficie respuesta para analizar los datos así como para elaborar las representaciones gráficas (Myers y Montgomery, 1995). El análisis de regresión de los datos obtenidos y la estimación de los coeficientes de la ecuación de regresión se realiza con el programa de diseño experimental Design Expert (versión 6.0.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EEUU, 2001). El ajuste del modelo de regresión obtenido se verifica mediante la determinación del coeficiente R^2 ajustado (R^2_{adj}). La significación estadística del modelo se determina mediante la aplicación de la prueba de Fischer (F-test), fijando el nivel de significación de p en valores inferiores a 0,05.

Tabla 5.- Diseño experimental SL (símplex-lattice), aplicado en la fase de barrido experimental para la localización de factores críticos.

emulgente		Presencia en la mezcla (%)					
EMF1 a EMF9 ¹		0	1,7	2,5	3,3	5	
Agua	80	85	86,7	87,5	90	95	98,3

¹ Se sigue la nomenclatura utilizada en la sección de materias primas (emulgentes).

Diseño experimental (2)

Como elemento base se utilizó un modelo de combinación de factores cualitativos y cuantitativos 2/3 en el que se analiza la significación de los factores *tipo de carotenoide* (β -caroteno, luteína, licopeno), *concentración carotenoide* (0,5 μ M, 1 μ M, y 2,5 μ M), *tipo de solución donadora* (suspensión carotenoide en Tween o complejos de inclusión carotenoide con β -ciclodextrina) e *inhibición* (adición de HDLs como inhibidores competitivos). Los resultados experimentales obtenidos se expresan como valores medios \pm desviación estándar. El análisis de varianza y la significación de las diferencias entre los valores experimentales se concretan mediante la aplicación del test de Duncan fijando el nivel de significación de p en valores inferiores a 0,01.

Métodos

Determinación de la actividad de triacilglicerol acil hidrolasa

Se utiliza el método descrito por Lehner y Verger (1997). La hidrólisis de p-nitrofenilpalmitato a su correspondiente forma libre, p-nitrofenol, es una medida de la actividad enzimática. El ensayo se realiza de la siguiente forma: 40 μ L de una disolución 125 mM de p-nitrofenilpalmitato se mezclan con 860 μ L de búfer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, y 0,01% de Tritón X-100), mezcla a la que se añaden 100 μ L de la muestra que contiene la suspensión de lipasa pancreática. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo durante una hora a 37 °C, y una vez finalizada, se determina el valor de absorbancia a 405 nm. Con la correspondiente recta de calibrado (elaborada previamente con p-nitrofenol estándar) se determina la cantidad de p-nitrofenol hidrolizado por el enzima. La actividad enzimática, U, se calcula a partir de la cantidad de producto formado, expresada en μ moles por mg de proteína y minuto.

Determinación de la concentración de proteínas

Se utiliza el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Smith y colaboradores (1985). Este ácido constituye el fundamento de un procedimiento analítico capaz de monitorizar iones Cu^+ formados tras la reacción de proteínas con iones Cu^{2+} (medio alcalino). Los iones Cu^+ originados, reaccionan con la sal disódica del ácido bicinconínico dando lugar a un compuesto de color violeta. El color producido es estable y su intensidad incrementa proporcionalmente con la concentración de proteínas existentes. El ácido bicinconínico utilizado se prepara según el siguiente protocolo: 100 volúmenes de reactivo A (solución acuosa al 1% $\text{Na}_2\text{-BCA}$, 2% Na_2CO_3 (monohidrato), 0,16% tartrato sódico, 0,4% hidróxido sódico y 0,95% NaHCO_3 , ajustada a pH 11,25 con disolución acuosa de hidróxido sódico 1 M) se mezcla con 2 volúmenes de reactivo B (solución acuosa al 4% $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$). El ensayo se realiza de la siguiente forma: 1 mL de ácido bicinconínico (BCA) se mezcla con 75 μ L de agua desionizada y, a continuación se añade 25 μ L de la muestra que contiene proteínas. La reacción se lleva a cabo durante 10 minutos a 60 °C, y una vez finalizada, se determina el valor de absorbancia a 562 nm. Con la correspondiente recta de calibrado (elaborada previamente con seroalbumina

bovina en concentraciones de 0 ppm a 10 ppm) se determina la cantidad de proteínas expresada en mg de proteínas por mL de preparación de vesículas de membrana de borde en cepillo.

Determinación de la actividad de sacarasa en vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC)

En un baño termostatzado a 37 °C, una alícuota de VMBC (100 µL) se incuba durante una hora con 200 µL de sacarosa 0,28 M. Transcurrido dicho período de tiempo, se interrumpe la reacción diluyendo la muestra con agua (1 mL) y calentamiento a 100 °C. La cantidad de glucosa liberada se determina siguiendo el método de medida a tiempo fijo descrito por Ngo y Lenhoff (1980). Los reactivos empleados fueron los siguientes: glucosa oxidasa y peroxidasa (1000 U y 300 U respectivamente, se disuelven en 10 mL de búfer fosfato sódico 0,1 M, pH 6,5, y posteriormente se diluyen a 100 mL con el mismo búfer), ácido-3-dimetilaminobenzoico (DMAB) (3 mmoles se disuelven en 100 mL del búfer fosfato sódico 0,1 M, pH 6,5), 3-metil-2-benzo-tiazolinona (MBTH) (60 µmoles se disuelven en 100 mL del búfer fosfato sódico 0,1 M, pH 6,5). Una vez preparados se mezclan en proporciones 1:1:1 (v/v/v) y se preincuban a 25 °C durante 5 minutos antes de adicionarle 20 µL de la muestra a analizar. Después de 15 minutos de incubación a 37 °C, se mide la absorbancia a 590 nm. Con la correspondiente recta de calibrado (elaborada previamente con glucosa estándar, concentraciones de 0 a 30 µM) se determina la cantidad de glucosa liberada. La actividad de sacarasa se calcula a partir de la cantidad de glucosa libre, expresada en µmoles de glucosa por mg de proteína y minuto.

Aislamiento de lipoproteínas de alta densidad del suero de oveja

Para obtener una fracción enriquecida en lipoproteínas de alta densidad, éstas se separan del resto de lipoproteínas del suero mediante precipitación y centrifugación (Warnick y colaboradores, 1985). Una alícuota de suero de oveja (2 mL) se mezclan con 0,2 mL de la solución de trabajo mezcla de heparina-cloruro de manganeso (0,6 mL de disolución de heparina con 40000 unidades USP/mL se mezclan con 10 mL de disolución de cloruro de manganeso (II) 1,06 M). La mezcla se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura

ambiente. Finalmente se centrifuga a $1500 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante contiene la fracción de HDL enriquecida en apoproteínas tipo A1-A2.

Determinación de la concentración carotenoide en los extractos vegetales concentrados y materias grasas para untar

Se utiliza el procedimiento descrito por Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez (1998). Una cantidad de materia prima (0,02 gramos en el caso de extractos vegetales, o 1 gramo de mantequilla/margarina) se mezclan con 50 mL de éter etílico. La mezcla se coloca en un embudo de decantación al que se añaden 10 mL de KOH en metanol (20%, p/v) para hidrolizar la materia grasa, reacción que se completa en una hora. A continuación se añaden 200 mL de solución acuosa de NaCl (10%, p/v), se agita suavemente permitiendo la separación de fases. La hipofase se descarta y la epifase se lava con agua destilada hasta que las aguas de lavado sean neutras. Finalmente la fase orgánica se lava 2 veces con 200 mL de solución acuosa de Na_2SO_4 (2%, p/v) y se filtra a través de un lecho sólido de Na_2SO_4 . El filtrado se evapora en un rotavapor y el residuo se redisuelve en un volumen exacto y conocido de disolvente orgánico. La absorbancia de una alícuota de la disolución obtenida se determina espectrofotométricamente a la longitud de onda máxima y se calcula la concentración de pigmento utilizando el coeficiente de extinción adecuado. En la Tabla 6 se exponen los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, la longitud de onda máxima y el disolvente en el que se realiza la determinación para los carotenoides utilizados en este estudio.

Tabla 6.- Coeficientes de absorción específicos ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$) utilizados para la determinación cuantitativa de la concentración carotenoide mediante medida espectrofotométrica¹.

Carotenoide	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	λ (nm)	disolvente
β -caroteno	2620 ²	450	acetona
Licopeno	3450 ³	472	éter de petróleo
luteína (libre o esterificada)	2340 ²	446	acetona
extracto de <i>Capsicum annuum</i> L.	2654 ⁴	456	acetona

¹ La concentración se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$c \text{ (g/mL)} = \frac{\text{unidades de absorbancia a } \lambda_{\text{max}}}{100 \times E^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

² Mínguez-Mosquera, 1997. ³ Davies, 1976. ⁴ Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998.

Elaboración de emulsiones

La elaboración de las emulsiones se realiza mediante la aplicación de la técnica *hot-melt coating* ya que los emulgentes suministrados funden fácilmente sin necesidad de elevar la temperatura de la mezcla en exceso. Los componentes, en las cantidades descritas en el apartado de diseño experimental (Tabla 5), se agitan en un baño calefactor agitador, durante una hora a 40 °C y posteriormente la emulsión se homogeneiza con un homogeneizador para líquidos (Ultra-Turrax, modelo T-25, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) durante dos minutos a velocidad máxima.

Determinación de la concentración carotenoide en emulsiones

En un tubo de ensayo de 15 mL se pesan 0,1 gramos de emulsionado cuyo contenido carotenoide se extrae mediante la adición de 2 mL de N,N-dimetilformamida, 4 mL de Na₂SO₄ (2%, p/v) y 4 mL de hexano. La mezcla se sonica en un baño de ultrasonidos durante cinco minutos, se agita dos minutos en vórtex, y se centrifuga a 4400 rpm durante cinco minutos. Una alícuota de la epifase se evapora en rotavapor y el residuo se redisuelve en un volumen exacto y conocido de acetona, para la determinación del valor de la absorbancia y cálculo de la concentración en las condiciones expresadas en la Tabla 6.

Procedimiento de separación y purificación aplicado a extractos oleosos concentrados de licopeno, luteína libre y β-caroteno

Para la obtención de disoluciones stock de los pigmentos mencionados (empleadas posteriormente en la elaboración de complejos de inclusión) se aplicó el procedimiento siguiente. Se solubilizan 0,02 gramos de la oleorresina en 25 mL de éter etílico. La disolución se introduce en un embudo de decantación y se añaden 10 mL de KOH en metanol al 10% (p/v). La reacción de saponificación transcurre durante 1 hora, al objeto de eliminar la materia grasa. Finalizada la reacción se añaden 200 mL de solución acuosa de NaCl (10%, p/v). Las fases, orgánica y acuosa, se separan desechándose la acuosa. La fase orgánica se lava con agua hasta neutralidad y dos veces con 200 mL de solución acuosa de Na₂SO₄ (2%, p/v). La fase orgánica se filtra a través de un lecho sólido de Na₂SO₄ y se evapora en rotavapor. El residuo se solubiliza con un volumen exacto de acetona (luteína y β-caroteno) o éter de

petróleo ligero (licopeno). En cada uno de los casos se utiliza la expresión para el cálculo de la concentración que aparece reflejada en la Tabla 6.

Preparación de suspensiones Tween carotenoide y de complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide

La suspensión Tween carotenoide se preparó según el procedimiento descrito por During y colaboradores (1998). Una alícuota de la disolución stock carotenoide se mezcla con 50 μ L de suspensión Tween 40 en acetona (20%, p/v) y se evaporan los disolventes bajo corriente de gas N_2 . El residuo se disuelve en el volumen adecuado de búfer (2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) y se agita en vórtex durante 1 minuto. La solución se prepara diariamente y se mantiene en cámara a 4 °C hasta su uso, momento en el que se vuelve a agitar en vórtex durante 1 minuto. Para la obtención de complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide se empleó el procedimiento descrito por Pfitzner y colaboradores (2000) con ligeras modificaciones. Una alícuota de la disolución estándar carotenoide se evapora y el residuo se redissuelve en 2 mL de cloruro de metileno. A continuación se adicionan 48 mL de etanol y β -ciclodextrina. La relación molar entre β -ciclodextrina y carotenoide se mantuvo en 20. La mezcla resultante se agita a 100 rpm en un baño termostatzado a 37 °C con agitación magnética durante 24 horas. Finalizado el proceso, se evapora en rotavapor y se lleva a sequedad utilizando una corriente de gas N_2 . El residuo sólido se homogeneiza y se almacena a -30 °C hasta su empleo.

Determinación de la concentración carotenoide en suspensiones Tween carotenoide y complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide

La concentración final de pigmento en solución se determina aplicando el siguiente procedimiento. Se solubilizan en agua (3 mL) 50 mg de complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide, o 1 mL de suspensión Tween y se añaden 8 mL de la mezcla N,N-dimetilformamida:hexano 1:1 (v/v). Para favorecer la separación de fases se añaden 5 mL de solución acuosa de NaCl (10%, p/v). La mezcla se agita durante 1 minuto en un agitador vórtex y se centrifuga a 4400 rpm durante 5 minutos. Se retira la fase orgánica y la fase acuosa se vuelve a extraer en las mismas condiciones. Las dos fases orgánicas se combinan y se

procede a la determinación espectrofotométrica, evaporando el hexano y redisolviendo en el disolvente adecuado, a la λ_{\max} correspondiente (Tabla 6).

Proceso de digestión in vitro

Se parte de una alícuota del extracto vegetal concentrado que contenga 100 μg de pigmento (β -caroteno, licopeno, luteína, o ésteres de luteína), o de 0,25 gramos de emulsión, o de 1 gramo de mantequilla/margarina. La muestra se coloca en un tubo de ensayo al que se añaden 5 mL de disolución de pepsina (0,05%, pH 2) y se incuba en un baño calefactor con agitación magnética durante una hora, a 37 °C, temperatura que se mantendrá constante durante todo el proceso de digestión *in vitro*. A continuación, el pH de la mezcla parcialmente digerida se ajusta a 7,4 adicionando 5 mL de búfer fosfato (0,1 M, pH 7,4), 30 mg de sales biliares y 250 μL de solución salina (NaCl 3 M, CaCl_2 75 mM). Esta mezcla se sonica durante diez minutos y posteriormente se incuba treinta minutos. Finalmente, se añaden 100 μL de una suspensión de lipasa pancreática porcina (50 mg/mL CaCl_2 5 mM), manteniendo la mezcla en agitación durante dos horas.

El procedimiento descrito se corresponde con las condiciones estándar de digestión, con las que se logra una eficiencia de micelarización del pigmento que se toma como referencia. Las condiciones de digestión (temperatura, agitación, tiempos de incubación, cantidad de enzimas) se mantienen constantes. Sí se introducirán cambios en la composición de la matriz a digerir (descritas en las secciones de diseño experimental 1 y 2). Estas modificaciones producirán (o no) una alteración en el valor de la eficiencia de micelarización, que se contrastará con el valor de referencia para determinar su importancia. De esta forma, se podrá determinar si la modificación introducida en el proceso de digestión es un factor significativo o no.

Separación de la fracción micelar

Se utiliza el método descrito por Hernell y colaboradores (1990). Una vez concluido el proceso de digestión, la mezcla se transfiere a tubos de policarbonato para ultracentrífuga (modelo L8-70M, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU) que se colocan en un rotor tipo 70.1 Ti. Las condiciones de ultracentrifugación son 49300 rpm durante 100 minutos a 4 °C.

Finalizado el proceso se toma una alícuota de 10 mL con una aguja (18 AWG) acoplada a una jeringa de 20 mL.

Extracción y cuantificación de carotenoides en la fracción micelar

Cuando la fracción micelar procede de la digestión de matrices lipofílicas (extractos vegetales y mantequillas/margarinas) se aplica el siguiente procedimiento. Una alícuota (5 mL) se vierte en un embudo de decantación y se procede a la extracción de la fracción carotenoide añadiendo 50 mL de éter etílico y 200 mL de una solución acuosa de NaCl (10%, p/v). Se añade una cantidad exacta y conocida de β -apo-8'-carotenal, como patrón interno para la posterior cuantificación. La mezcla se agita suavemente permitiendo la separación de fases por decantación, descartando la fase acuosa. La epifase se lava dos veces con Na₂SO₄ (2%, p/v) y se filtra sobre un lecho sólido de Na₂SO₄ evaporando el filtrado en un rotavapor. El residuo seco se redissuelve con 200 μ L de acetona de HPLC almacenando la muestra a -30 °C hasta su análisis. La cuantificación carotenoide se realiza mediante la aplicación del método desarrollado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). Se trata de un sistema de separación cromatográfica en fase reversa (columna C₁₈ Spherisorb ODS2, 250 mm x 4 mm, tamaño de partícula de 5 μ m). El método emplea un gradiente binario acetona:agua en la proporción inicial de 75:25, a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La cantidad de muestra inyectada es de 50 μ L. El cromatógrafo está controlado por un software de gestión de la señal y de los datos cromatográficos, que contiene la información necesaria (rectas de calibrado y factores de respuesta) para la cuantificación de las muestras en base a la cantidad de patrón interno que se adiciona durante el proceso de extracción.

Cuando la fracción micelar procede de la digestión de matrices hidrofílicas (emulsionados) se aplica el siguiente procedimiento. Una alícuota (4 mL) se mezcla con 26 mL de N,N-dimetilformamida, 4 mL de Na₂SO₄ (2%, p/v) y 4 mL de hexano. La mezcla se sonica en un baño de ultrasonidos durante cinco minutos, se agita dos minutos en vórtex, y se centrifuga a 4400 rpm durante cinco minutos. Una alícuota de la epifase se evapora en rotavapor y el residuo se redissuelve en un volumen exacto y conocido de acetona, para la determinación del valor de la absorbancia y cálculo de la concentración en las condiciones expresadas en la

Tabla 6. En la Figura 9 se representa un esquema del procedimiento experimental, así como los métodos aplicados en cada etapa.

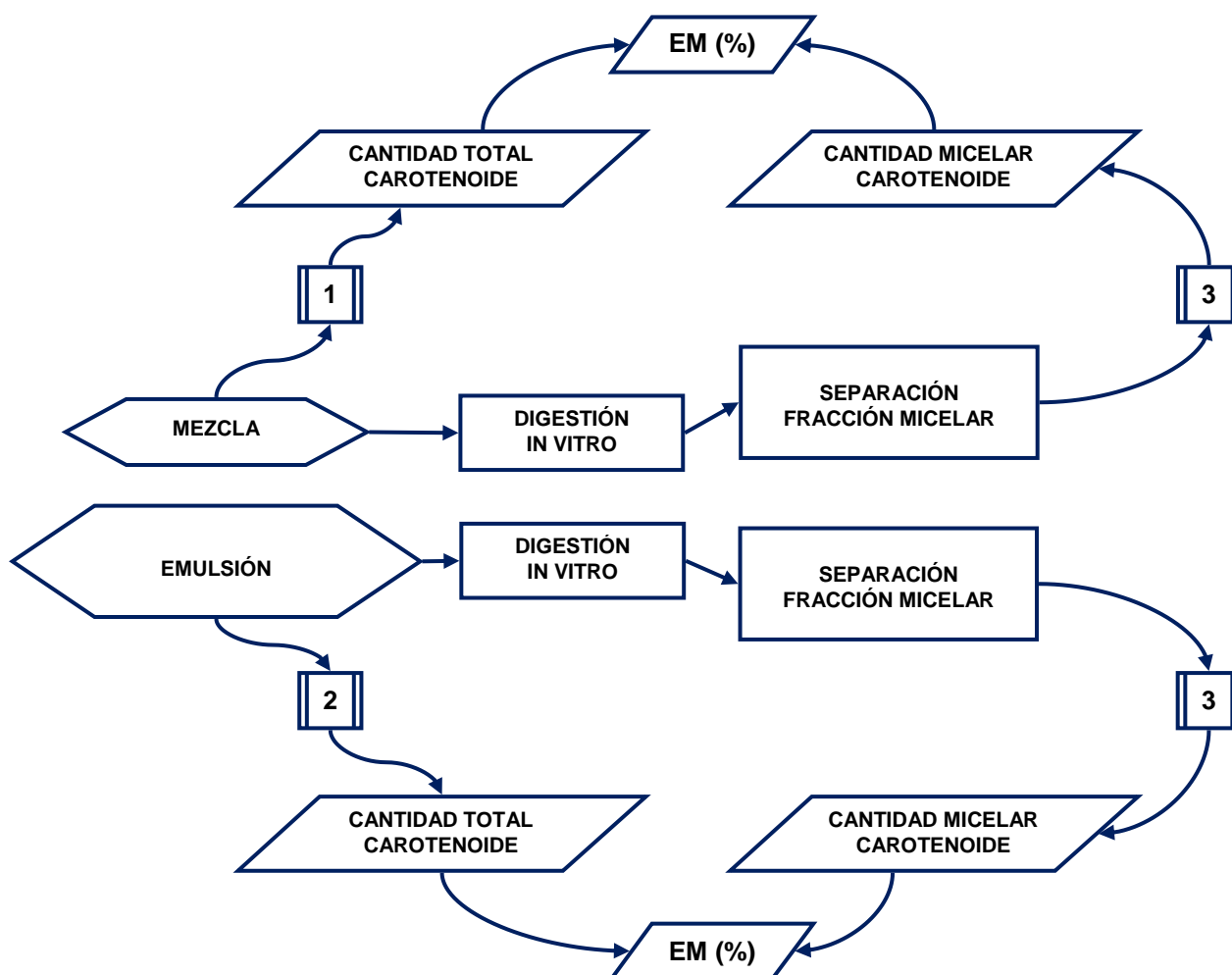


Figura 9.- Esquema del procedimiento experimental, aplicado a mezclas modelo y a emulsiones para la obtención de valores de eficiencia de micelarización (EM) aplicando las metodologías descritas en los siguientes apartados: **1:** *Determinación de la concentración carotenoide en los extractos vegetales concentrados y materias grasas para untar.* **2:** *Determinación de la concentración carotenoide en matrices hidrofílicas (emulsiones).* **3:** *Extracción y cuantificación de carotenoides en la fracción micelar.*

Obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC)

Para la obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo se emplea el procedimiento descrito por Hauser y colaboradores (1980), utilizando tejido intestinal de cerdo. El tejido fresco, transportado hasta el laboratorio en búfer (12 mM Tris-HCl, 0,3 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) mantenido en hielo, se perfunde con disolución fisiológica salina helada, y se trocea en piezas de 20-25 gramos de peso, congelándolas a -80 °C hasta su uso. Para la preparación de VMBC, el tejido congelado se trocea en piezas de 1 g de peso, aproximadamente. Los fragmentos se colocan en un vaso, introducido en un baño de hielo, al que se añaden 60 mL de búfer (12 mM Tris-HCl, 0,3 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) manteniéndolo en reposo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la suspensión resultante (mantenida en hielo) se agita durante 90 segundos con un Vibromixer (100 Hz, Graber Pfenninger, Stäfa, Suiza) y se filtra a vacío. El filtrado se diluye con 300 mL de agua helada y se homogeneiza empleando un homogeneizador para líquidos (Ultra-Turrax, modelo T-25, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) durante 3 minutos. A continuación se añade $MgCl_2$ sólido hasta conseguir una concentración final en la mezcla de 10 mM, y se repite la homogeneización durante un minuto. La suspensión resultante se centrifuga a $12000 \times g$ durante 5 minutos a 4 °C (centrífuga modelo Avanti J-25, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU, equipada con un rotor tipo JA 25,50). En esta centrifugación, el pellet originado, que contiene restos celulares y otros contaminantes, se descarta. El líquido sobrenadante se centrifuga de nuevo a $48000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C. En esta ocasión, se descarta el líquido sobrenadante, y el pellet obtenido se resuspende en 50 mL de búfer (2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) y se homogeneiza empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem (10 pases). El homogeneizado se centrifuga a $48000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C, se desecha el líquido sobrenadante y el pellet (VMBC purificadas) se almacena a -80 °C hasta su uso.

Proceso de asimilación in vitro e inhibición del transporte de carotenoides mediante lipoproteínas AP1

Las vesículas elaboradas en la etapa previa se resuspenden en 15 mL de búfer (2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) y se homogeneizan empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem (10 pases). Antes de realizar el ensayo, en cada una de las preparaciones de vesículas de membrana de borde en cepillo obtenidas para llevar a cabo los experimentos, se procede a su caracterización de forma rutinaria determinando el contenido de proteínas, mediante el método del ácido bicinónico (Smith y colaboradores, 1985) y la actividad de sacarasa intestinal (Dahlqvist, 1964; Ngo y Lenhoff, 1980). Para realizar el ensayo de asimilación y/o inhibición se parte de un volumen de preparación de VMBC que contenga 2 mg de proteína. Esta alícuota se preincuba durante 5 minutos en un baño termostatzado a 37 °C con agitación a 250 rpm. En aquellos ensayos en los que se realiza además la inhibición de la asimilación carotenoide se adicionó al comienzo del periodo de preincubación una solución de HDL (50 µg de proteína/mL de preparación VMBC). Finalizado el periodo de preincubación (con o sin solución HDL) se añade la solución donante (suspensión carotenoide Tween o solución de complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide) y el ensayo transcurre en las mismas condiciones pero durante 20 minutos. Se realizaron ensayos con tres concentraciones de carotenoide en el medio de incubación: 0,5 µM, 1 µM y 2,5 µM, concentraciones normalizadas a la cantidad de proteína. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifuga a $48000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C (centrífuga modelo Avanti J-25, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU, con un rotor tipo JA 25,50). Se desecha el líquido sobrenadante y el pellet se redisuelve en 1 mL de búfer (2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1) para su posterior análisis (ver apartado siguiente). Para cada pigmento, concentración y formato de solución donante (Tween o complejo de inclusión) se realizaron 3 determinaciones.

Extracción y cuantificación de carotenoides asimilados por VMBC e inhibidos por apolipoproteínas A1

Para la extracción y cuantificación de carotenoides (procedentes de suspensión carotenoide Tween o solución de complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide) asimilados por VMBC y/o inhibidos por HDL se aplica el siguiente procedimiento. Al pellet obtenido en la etapa anterior redissuelto en 1 mL de búfer (2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA, pH 7,1), se le añade una cantidad exacta y conocida de β -apo-8'-carotenal, como patrón interno para la posterior cuantificación. A continuación se adiciona 1 mL de N,N-dimetilformamida, 1 mL de etanol y 6 mL de la mezcla (hexano: diclorometano 5:1, 1% BHT). Se sonica 5 minutos en un baño de ultrasonidos, se agita 1 minuto en vórtex y se vuelve a sonicar 5 minutos más. Se centrifuga a 4400 rpm durante 5 minutos. Se recoge la fase orgánica y se evapora en corriente de gas N_2 . El residuo seco se redissuelve con 250 μ L de acetona de HPLC almacenando la muestra a -30 °C hasta su análisis. La cuantificación carotenoide se realiza mediante el procedimiento ya comentado anteriormente desarrollado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). En la Figura 10 se representa un esquema del procedimiento experimental, así como los métodos aplicados en cada etapa.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtienen en un espectrómetro de masas Finnigan MAT95's (Finnigan Mat, Bremen, Alemania) equipado con una interfase de ionización por electrospray (ESI) operando en modo negativo. Las soluciones para su análisis por esta técnica se prepararon disolviendo una alícuota de la muestra en una mezcla de agua:alcohol isopropílico:ácido fórmico (75:25:0,1) (v/v/v). Las muestras se introdujeron en la interfase ESI mediante su infusión con una bomba que operaba a 20 μ L/min como velocidad de flujo. El espectro de masas se obtuvo bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial del capilar 200 °C, fijando el voltaje del nebulizador a 3 kV, y el voltaje de la lente, el "skimmer" y el octapolo se fijaron al valor adecuado para obtener la respuesta óptima calibrando con una solución patrón de β -ciclodextrina. Como gas portador se utilizó nitrógeno a una presión de 15 psi. La colisión que induce la disociación se verificó en la región de la lente (CID) y se promovió

aplicando simultáneamente un voltaje de 20 V tanto al capilar como a la lente o bien modificando el voltaje del cono. Es importante tener en cuenta que cuando se obtiene el espectro de masas de los complejos de inclusión hay que poder distinguir entre los complejos moleculares y los aductos electroestáticos (asociaciones de moléculas obtenidas mediante la separación del complejo y la posterior asociación molecular) que se puedan formar durante el análisis. Para concretar si los aductos electroestáticos aparecen durante el análisis se incrementó el voltaje en el orificio del skimmer con lo que la posibilidad de formación de aductos y clústers incrementa. Los experimentos no mostraron una reducción sustancial de la presencia de los iones representativos de los complejos de inclusión, incluso incrementando el voltaje del cono o en la región CID. Por otro lado, el uso de calentamiento del capilar para disociar el complejo podría proporcionar información adicional respecto de las propiedades de iones complejos entre la β -ciclodextrina y luteína en fase gaseosa. Se realizaron diversos ensayos incrementando la temperatura del capilar desde 150 °C a 300 °C para promover, si se habían formado previamente, la ruptura de aductos electroestáticos. Los resultados mostraron que en los espectros de masas el ión de complejo de inclusión seguía predominando por lo que la energía de asociación entre el pigmento y la β -ciclodextrina es lo suficientemente elevada como para que el complejo permanezca estable a altas temperaturas.

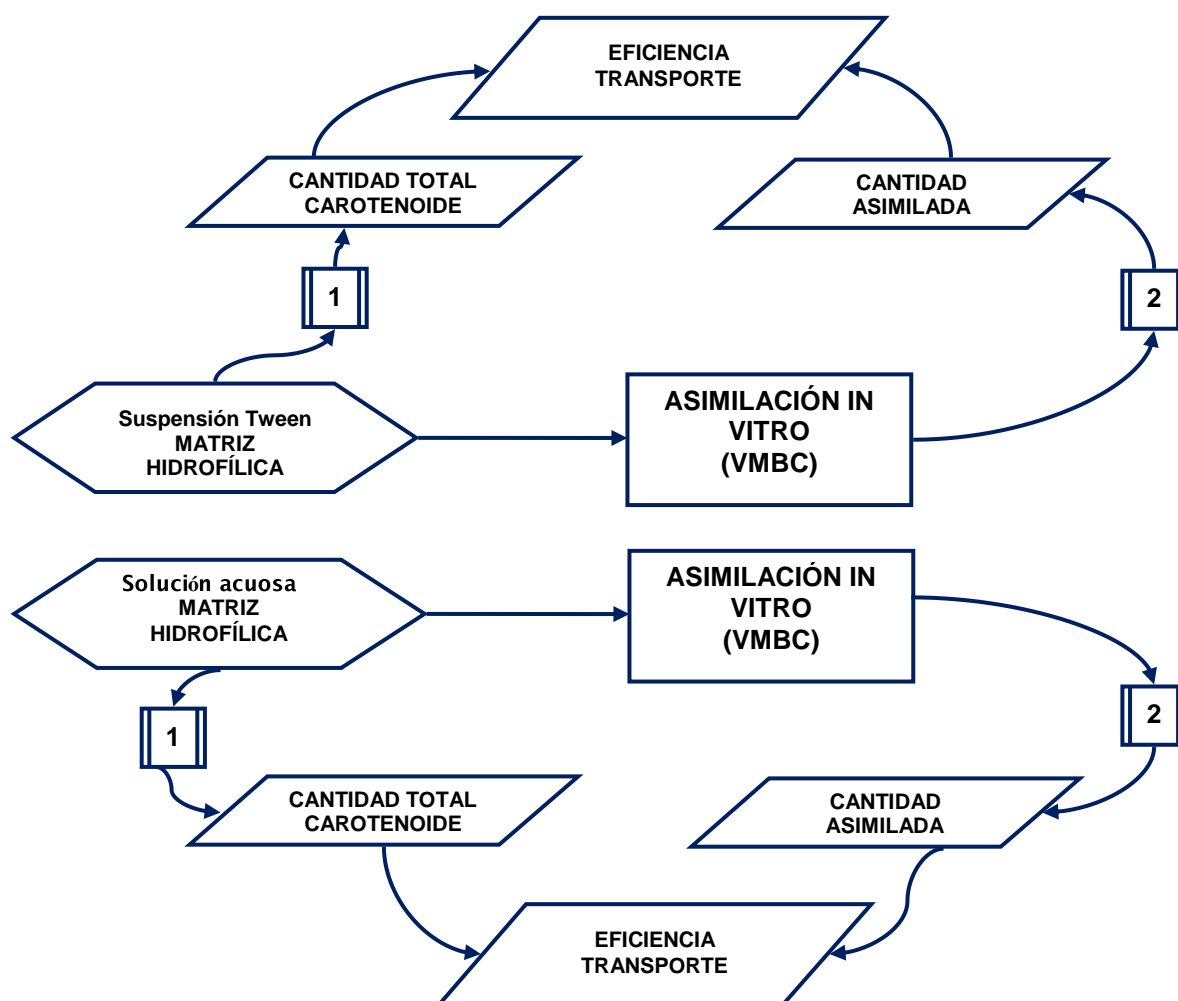


Figura 10.- Esquema del procedimiento experimental, aplicado a la suspensión carotenoide en Tween o a la solución acuosa de carotenoide en complejo de inclusión para la obtención de valores de eficiencia de transporte aplicando las metodologías descritas en los siguientes apartados: 1: *Determinación de la concentración carotenoide en matrices hidrofílicas (suspensión Tween o complejos de inclusión con β -ciclodextrina).* 2: *Extracción y cuantificación de carotenoides asimilados por vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC).*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es difícil que la Naturaleza se ajuste a un prototipo. La teoría atómica de Dalton, la teoría de la evolución de Darwin, la teoría de la relatividad de Einstein, son eso, teorías, más o menos comprensibles, más o menos elaboradas, más o menos ciertas. Pero gracias a ellas conseguimos observar la realidad desde nuestra perspectiva, e incluso, en el marco de las condiciones experimentales que indica la teoría o modelo, reproducirla. Con toda seguridad los enigmas de la ciencia normal son complicados, pero también es cierto que las mediciones tomadas sin un prototipo conducen muy raramente a alguna conclusión definida.

No se puede pretender que los modelos no tengan fallas, o que, a medida que los recursos y conocimientos avancen, aquellos no queden obsoletos y se sustituyan por otros más realistas aunque no necesariamente por ello, más reproducibles y fiables que el modelo primitivo. En cada época, el experimentador debe dar respuesta a las incógnitas que se plantea, o que le plantean, con las habilidades y destrezas adquiridas y con los recursos y métodos de los que dispone. Y en ocasiones, un procedimiento experimental sencillo, se convierte en un buen método para: 1, contrastar la realidad y comprender cómo ciertos factores participan de ella y 2, obtener datos experimentales *modelo*, fiables, reproducibles, realistas pero no necesariamente idénticos a la realidad, con los que elaborar una hipótesis, un producto, o incluso un nuevo modelo sin que necesariamente se tenga que recurrir de forma continua a la realidad para ello. No hay que olvidar que, como expresa Hegel, la realidad objetiva es como es y el único soporte relativo que poseen nuestras ideas es el que nos reporta la práctica humana, que por desgracia también pasa a nuestro acervo por un proceso de interpretación.

Con los modelos de digestión y asimilación *in vitro* que se han utilizado en este estudio se han obtenido una serie de datos de cuyo análisis se ha elaborado una visión de cómo ciertos factores modulan la digestibilidad y asimilación de los compuestos bioactivos en estudio, los carotenoides. Durante la exposición de resultados y su discusión el lector encontrará referencias a resultados obtenidos con modelos de experimentación *in vivo*, (humanos o animales). Con ello no se pretende tranquilizar las inquietudes de los más críticos, ni garantizar y comprobar la validez del modelo *in vitro*, aunque al comparar resultados con los

obtenidos con otros modelos ésta queda en parte justificada, sino, como todo buen experimentador, buscar contrastes, complementariedades, excepciones, e incluso confrontaciones, para comprender una realidad y concluir que de ambas formas *ad verum ducit*.

Factores implicados en la micelarización de carotenoides en matrices lipofílicas

Si se puede destacar alguno de los factores que modifican la eficiencia de la micelarización (EM) de carotenoides, incluidos en este estudio, el factor *tipo y mezcla de carotenoides* puede resultar el más llamativo. Si consideramos la estructura química de los carotenoides, evidentemente, ésta tiene una importante zona común a todos estos pigmentos, la cadena polienoica, por la que se podría asumir un comportamiento similar frente a diferentes procesos físico-químicos. Sin embargo, las particularidades estructurales (grupos colocados en ambos extremos de la cadena) modifican sustancialmente la conducta de estos compuestos y son el origen de las interacciones detectadas. En la Figura 11 se representan la EM de licopeno obtenida aplicando el proceso de digestión *in vitro* en condiciones estándar y cuando, a la mezcla a digerir con licopeno, se añadió una cantidad idéntica de luteína o de ésteres de luteína. En estos dos últimos experimentos se produce un descenso significativo de la EM de licopeno, más acusado en el caso de la adición de ésteres de luteína, respecto a la observada en el experimento control. En el presente estudio, *in vitro*, se puede concretar que en la fase de micelarización se produce una interacción entre carotenoides por la incorporación a las micelas. Algunos autores ya habían apuntado que en la fase de micelarización se podía producir una competencia entre diversos carotenoides por su incorporación micelar, (White y colaboradores, 1993; Brown y colaboradores, 1997; O'Neill y Thurnham, 1998) aunque al tratarse de estudios *in vivo*, no se podía descartar que la competencia también se produjera durante la posterior fase de asimilación (van den Berg, 1999). Cuando se parte de una emulsión de dos tipos de carotenoides, su disposición en gotas lipídicas será diferente en función de la polaridad de cada uno. La diferente configuración estructural de los grupos laterales (lineales en el caso de licopeno y cíclicos en el caso de luteína) y la presencia de hidroxilos provee a luteína de una mayor polaridad lo que provoca su colocación en la zona exterior de las gotas lipídicas facilitando su trasvase desde la matriz lipofílica a las micelas

donde también se van a incorporar en la zona exterior y no en su corazón que alberga a compuestos de menor polaridad. Por el contrario, los carotenoides apolares parten de la zona interna de las gotas lipídicas y tienen que alcanzar el interior de la micela. A pesar de este efecto de competencia detectado, la EM de licopeno es siempre superior a la de luteína y a la de los ésteres de luteína tanto en los experimentos control como en los experimentos mezcla, es decir, la interacción de luteína o ésteres de luteína con licopeno no consigue decantar el valor de EM a favor de los primeros. El estudio de Tyssandier y colaboradores (2001) también había demostrado que la presencia de luteína en el medio tenía un efecto negativo sobre la micelarización de carotenos, pero estos últimos no tenían ningún efecto sobre el primero. Sin embargo, en este trabajo se ha observado que al partir de una mezcla licopeno:luteína, además de disminuir, la EM de licopeno, se incrementa la EM de luteína tal y como se representa en la Figura 12. La digestibilidad depende en gran medida de la polaridad de los carotenoides. La excepción a este supuesto se materializa cuando se analizan los resultados de la mezcla licopeno:ésteres de luteína. En este caso, y como se ha expuesto anteriormente, es cuando la EM de licopeno registra un mayor descenso respecto al experimento control (Figura 11) y sin que ello suponga efecto alguno (ni incremento ni descenso) en la EM de los ésteres de luteína (Figura 12). La esterificación de la xantofila implica la presencia de un entorno lipídico molecular que, a efectos de la micelarización, elimina las características que surgen de la estructura del pigmento y lo hacen comportarse como un lípido más, y como tal tiene un efecto negativo sobre la EM de licopeno. De hecho, este caroteno tampoco muestra ningún efecto sobre la EM de ésteres de luteína. Esta misma observación se denota cuando se incrementa la cantidad de materia grasa en la digestión de licopeno (Figura 13), efecto que se comentará a continuación.

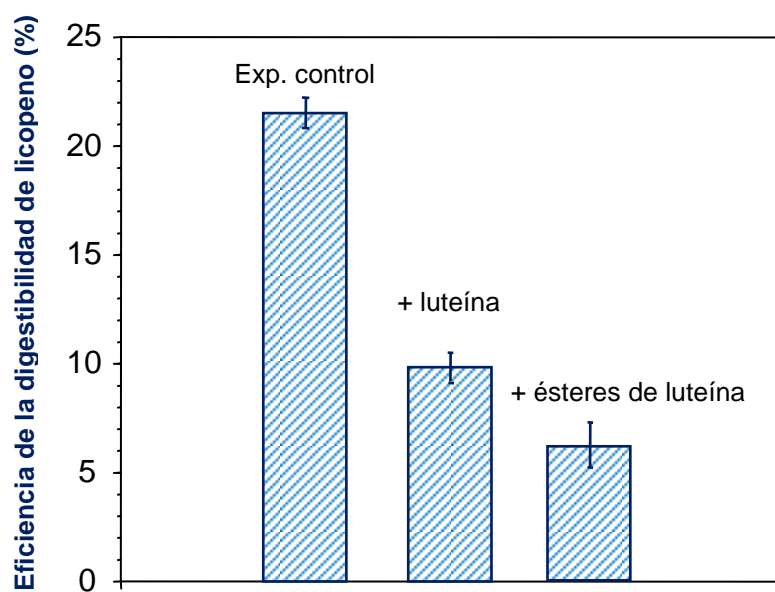


Figura 11.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de licopeno en los experimentos control, mezcla con luteína y mezcla con ésteres de luteína.

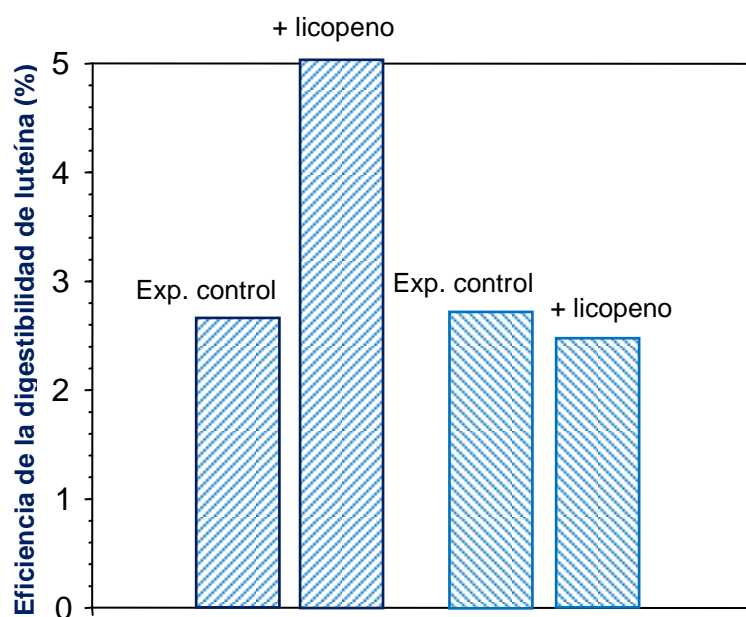


Figura 12.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de luteína (diagonal hacia arriba) o ésteres de luteína (diagonal hacia abajo) en los experimentos control, mezcla con licopeno.

Las Figuras 13, 14 y 15 representan la EM de licopeno, luteína y ésteres de luteína, respectivamente, cuando distintas cantidades de aceite se adicionan a la matriz. Esta adición causó cambios en la EM de diferente magnitud en cada caso. Se observa como la eficiencia de micelarización de luteína es independiente de la cantidad de aceite añadido inicialmente. No obstante, este comportamiento no se extiende a licopeno y ésteres de luteína, que modifican su EM cuando se incorpora una mayor cantidad de materia grasa, aunque el efecto tiene un signo opuesto para cada pigmento. La EM de licopeno se reduce prácticamente un 50% al incorporar 100 μ L de aceite a la mezcla a digerir (en el experimento control se alcanza un valor de EM = 21,47% y se pasa a un valor de EM = 11,51%). Por el contrario, la EM de ésteres de luteína incrementa su valor al incorporar aceite a la mezcla a digerir (en el experimento control se alcanza un valor de EM = 3,03% y se pasa a un valor de EM = 6,95%). Independientemente de la clase de carotenoide, la adición de 300 μ L de aceite no supuso una modificación de los cambios observados en el valor de EM respecto a los experimentos con 100 μ L de aceite.

En los experimentos realizados al efecto de controlar la interacción entre los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *tipo y mezcla de carotenoides* (partiendo de mezclas binarias de carotenoides en proporción 1:1 y adicionando aceite) también se observaron cambios de diferente intensidad en la EM. En las Figuras 16 y 17 se representan los valores de EM para licopeno en mezcla con luteína, y licopeno en mezcla con ésteres de luteína, respectivamente, mientras que en las Figuras 18 y 19 se representan los valores de EM para luteína y ésteres de luteína ambos en mezcla con licopeno, respectivamente.

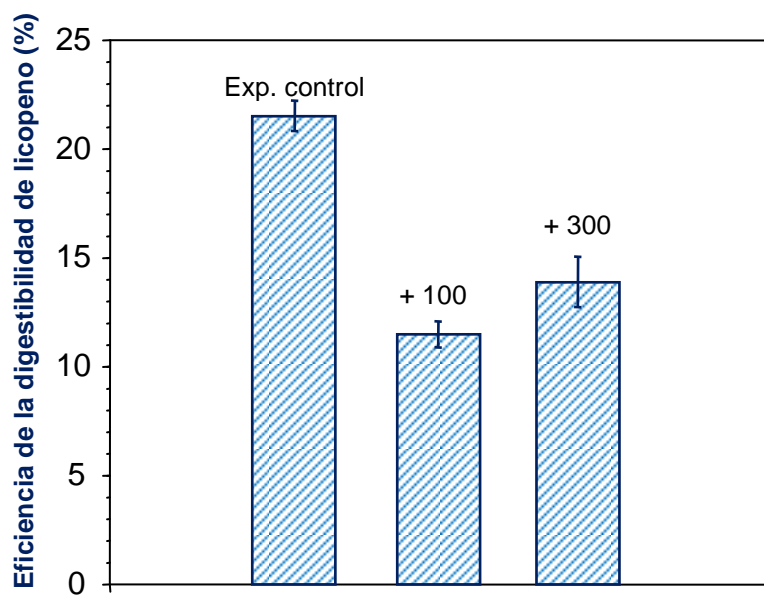


Figura 13.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de licopeno en los experimentos control, y adición de aceite.

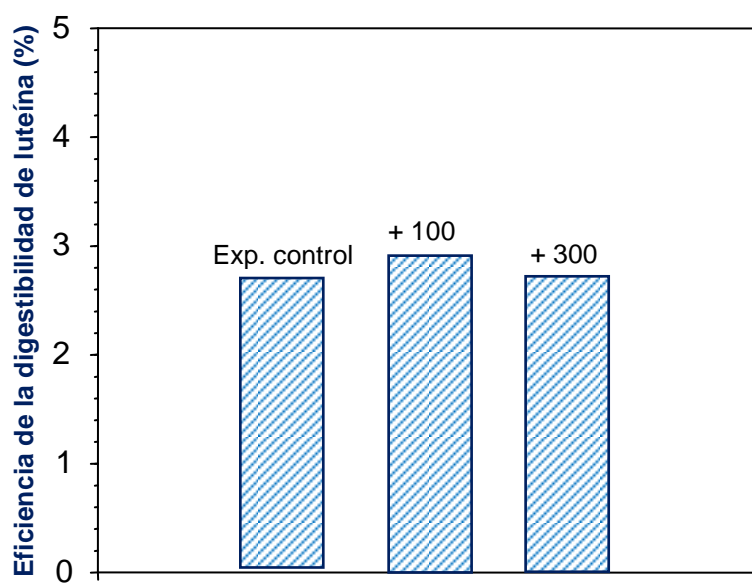


Figura 14.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de luteína en los experimentos control, y adición de aceite.

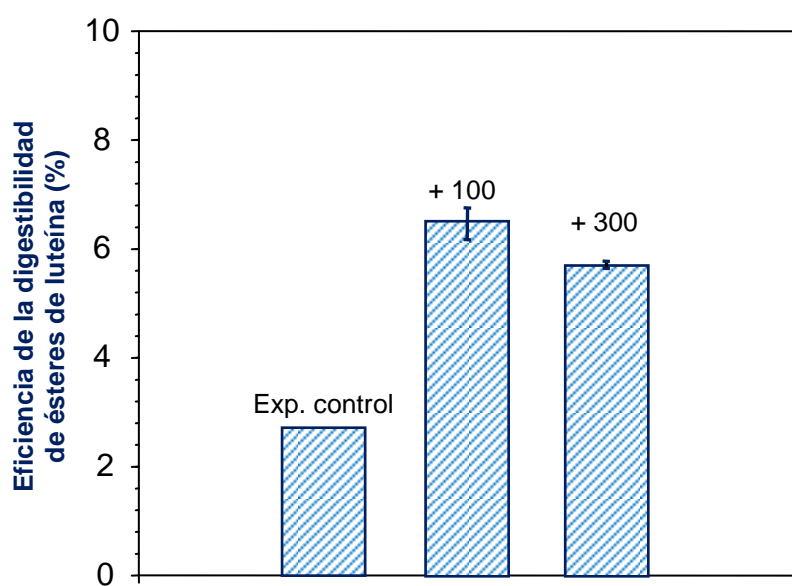


Figura 15.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de ésteres de luteína en los experimentos control, y adición de aceite.

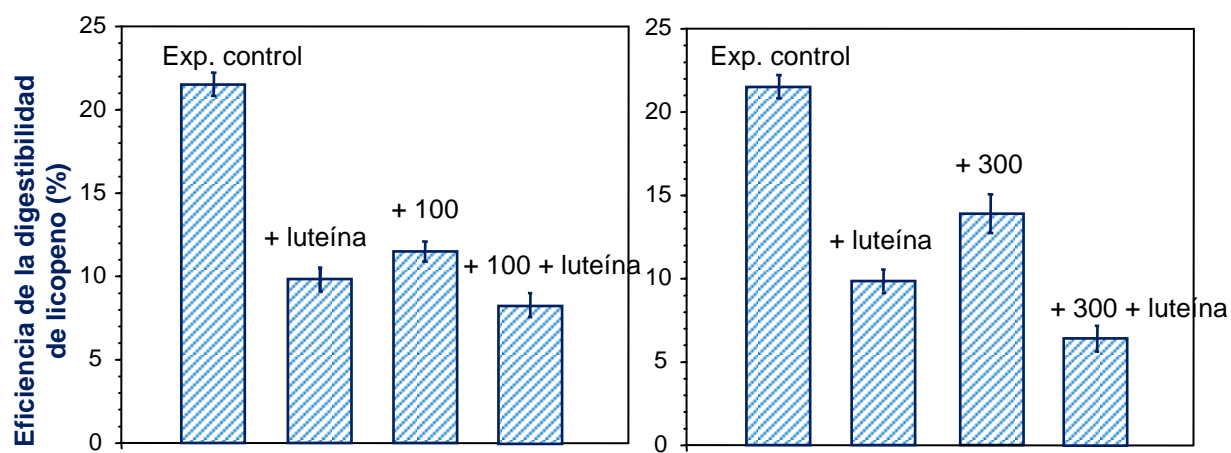


Figura 16.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de licopeno en los experimentos control, mezcla con luteína, adición de aceite, y mezcla con luteína y adición de aceite.

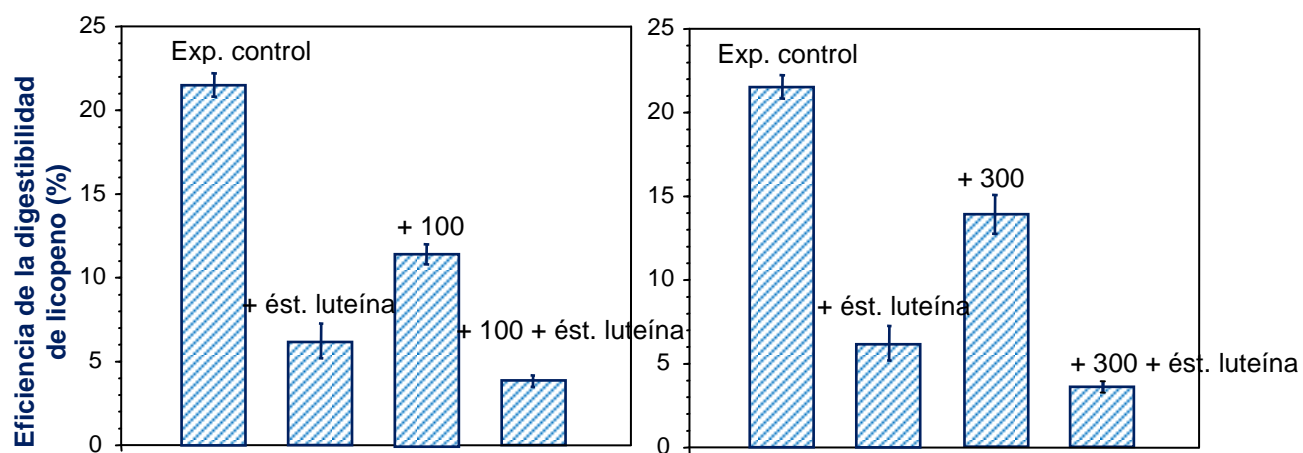


Figura 17.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de licopeno en los experimentos control, mezcla con ésteres de luteína, adición de aceite, y mezcla con ésteres de luteína y adición de aceite.

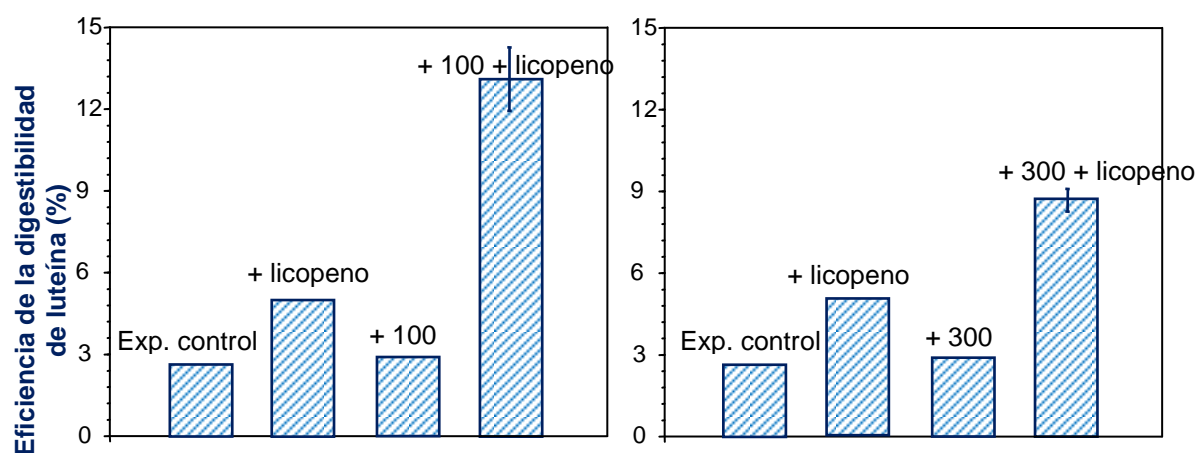


Figura 18.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de luteína en los experimentos control, mezcla con licopeno, adición de aceite, y mezcla con licopeno y adición de aceite.

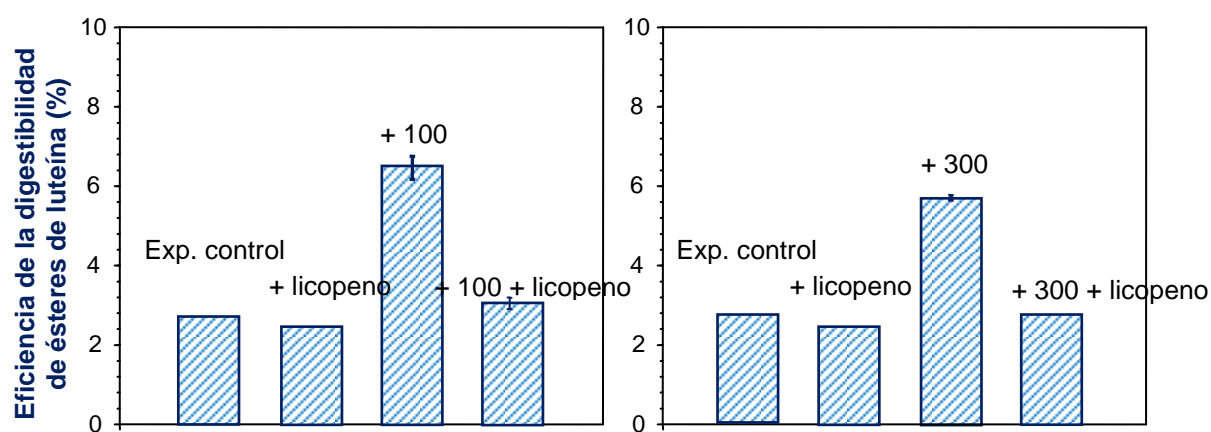


Figura 19.- Datos correspondientes a la eficiencia de micelarización (valores porcentuales) de ésteres de luteína en los experimentos control, mezcla con lycopeno, adición de aceite, y mezcla con lycopeno y adición de aceite.

Las modificaciones observadas para la EM, cuando se combinan al unísono los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *tipo y mezcla de carotenoides* van a mostrar una tendencia similar a la observada para el efecto *tipo y mezcla de carotenoides* pero con valores de respuesta incrementados. Así, para la mezcla licopeno:luteína, la adición de 100 μL de aceite incrementó el nivel de micelarización de luteína respecto al experimento control (de un valor de EM = 2,63%, se pasa a un valor de EM = 12,47%), incremento significativo que también se había observado cuando se controló el factor *tipo y mezcla de carotenoides*, aunque dicho aumento no fue tan acusado. En estas condiciones de experimentación (mezcla binaria de carotenoides y con aceite) la EM de licopeno disminuyó significativamente respecto al valor del experimento control hasta un valor no significativamente diferente al mostrado cuando se controló la mezcla binaria licopeno:luteína sin aceite (experimento control EM = 21,47%, experimento mezcla binaria sin aceite EM = 9,82%, experimento mezcla binaria con aceite EM = 8,27%). Para la mezcla licopeno:ésteres de luteína, la presencia de aceite no modificó la EM de ésteres de luteína (sí se había observado un incremento significativo cuando se controló el factor *cantidad de aceite en la matriz*), pero en cambio sí disminuyó la EM de licopeno a un valor (3,82%) incluso inferior a la EM de licopeno en mezcla con ésteres de luteína (sin la adición de aceite, 6,18%).

Cuando se incrementó la cantidad de aceite de 100 μL a 300 μL , manteniendo la mezcla binaria de pigmentos en proporción 1:1, para licopeno se observó un nuevo descenso en el valor de su EM (tanto en mezcla con luteína como en mezcla con ésteres de luteína), para luteína se detectó un valor de EM que sigue siendo significativamente superior a los mostrados en todos sus experimentos anteriores (experimento control, en mezcla con licopeno, y con la adición de aceite) y para ésteres de luteína no se observó ningún efecto o modificación de su EM respecto a los experimentos control y mezcla con licopeno.

Los resultados obtenidos indican la existencia de una interacción significativa entre los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *tipo y mezcla de carotenoides*. En la Tabla 7 se recogen los estadísticos correspondientes al análisis de varianza de los efectos principales incluidos en el presente estudio así como de sus interacciones. Según el análisis de regresión

de los datos experimentales, éstos se ajustan a un modelo factorial, con los siguientes factores (o efectos) significativos *cantidad de aceite en la matriz*, *tipo y mezcla de carotenoides* y la interacción entre ambos. El valor F del modelo (71,71) implica que el modelo es significativo con una probabilidad del 0,01% de que éste pudiera deberse al *ruido* experimental. En la tabla no se incluyen valores estadísticos que indican la bondad del modelo pero que se detallan a continuación. Las cantidades de R^2 y R^2_{adj} se corresponden con 0,926 y 0,913 respectivamente. La precisión adecuada alcanza un valor de 22,89.

La interacción de los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *tipo y mezcla de carotenoides* resulta estadísticamente significativa (más adelante se comentarán la significación estadística del resto de interacciones). Como se ha indicado en la exposición de resultados, el factor *cantidad de aceite en la matriz* es significativo pero la tendencia de los cambios que éste provoca en los valores de EM depende del tipo de pigmento. Por otro lado, esta interacción va a incrementar el efecto observado de competencia entre pigmentos, expuesto en las Figuras 11 y 12, en el mismo sentido que aquel hubiera sido. La competencia entre pigmentos, observada en ese conjunto de experimentos, se combina con la presencia de aceite en la solución inicial de pigmentos a digerir. Así, si para licopeno la adición de otro pigmento supuso un descenso en la EM, cuando además se adicionó aceite la EM disminuyó aún más. Por el contrario, para luteína la adición de otro pigmento supuso un aumento en la EM, y cuando además se adicionó aceite, la EM incrementó aún más. No sólo es importante la cantidad de grasa sino también el tipo de pigmento y la mezcla.

En estudios *in vivo* se había observado una interacción entre los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *tipo y mezcla de carotenoides*, estudios en los que se analizó el efecto de la presencia de grasa en la dieta sobre la absorción de carotenoides, aunque la mayoría de estos ensayos se centraban sólo en β -caroteno (Jayarajan y colaboradores, 1980; Prince y Frisoli, 1993; Jalal y colaboradores, 1998; Roodenburg y colaboradores, 2000). Estos estudios sugieren que se necesita una mínima cantidad de grasa (3-5 gramos) en la matriz a digerir, para asegurarnos la absorción intestinal del caroteno. Sin embargo, Roodenburg y colaboradores (2000) concluyeron que añadir a la matriz más cantidad de grasa que la mínima necesaria para la absorción, no nos asegura un aumento de la bioaccesibilidad final del

pigmento. Nuestros resultados claramente apoyan esta conclusión. La presencia de 300 μL de aceite en la solución inicial del carotenoide a digerir, en solución individual, ofrece la misma accesibilidad final para el pigmento que la solución que contiene sólo 100 μL de aceite. Pero los resultados obtenidos también indican que en función del tipo de pigmento considerado, su EM, es decir, su digestibilidad potencial, incrementará o disminuirá en función de sus características físico-químicas. La presencia en la mezcla de otro pigmento es la que promueve las modificaciones debido al proceso de interacción.

Tabla 7.- Análisis de varianza del experimento *factores implicados en la micelarización de carotenoides en matrices lipofílicas*.

factor	\sum cuadrados	GL	cuadrado	valor F	p
modelo	7,73	7	1,10	71,71	<0,0001
1	1,88	1	1472,14	122,36	<0,0001
2	$2,67 \times 10^{-4}$	1	1,22	0,017	0,8959
3	0,38	1	1090,24	24,50	<0,0001
interacción 1/2	0,01	1	23,35	0,66	0,4220
interacción 1/3	5,24	1	2674,96	340,23	<0,0001
interacción 2/3	0,11	1	35,41	7,46	0,0094
interacción 1/2/3	0,10	1	7,68	6,77	0,0130

1, tipo y mezcla de carotenoides; 2, cantidad de colesterol en la matriz; 3, cantidad de aceite en la matriz

Se ha expuesto que para ésteres de luteína, un incremento de la cantidad de aceite supuso un aumento significativo en la proporción del pigmento micelarizado. En el estudio de Roodenburg y colaboradores (2000), la bioaccesibilidad de ésteres de luteína también se incrementó significativamente cuando aumentó la cantidad de grasa en la dieta. Según ese estudio, este aumento en la cantidad de grasa ingerida incrementaría la capacidad de emulsionar a los ésteres de luteína, lo que es necesario y fundamental para su posterior incorporación micelar, debido a su mayor liposolubilidad en comparación a la de carotenos y xantofilas. Nuestros resultados demuestran que la adición de 100 μ L de aceite, proporciona las condiciones más adecuadas para facilitar la emulsión de ésteres de luteína y su posterior micelarización.

Pero el comportamiento detectado para ésteres de luteína no se reproduce con licopeno y luteína. Se observa como la eficiencia de micelarización de licopeno disminuyó cuando se adicionó aceite en la solución inicial a digerir. Es posible que las necesidades físico-químicas en cuanto a concentración de sales biliares y actividad de la lipasa, para emulsionar licopeno, sean muy diferentes a las empleadas para emulsionar ésteres de luteína, cuando se incrementa la cantidad de aceite en la solución. En el estudio de Roodenburg, el incremento de grasa en la ingesta supuso una disminución en la bioaccesibilidad final de carotenos como α - y β -caroteno, aunque las diferencias no fueron significativas respecto a las observadas cuando se ingiere una comida de menor contenido en grasas. Esta disminución podría correlacionarse con la obtenida, en nuestro caso para licopeno, cuando se incrementa la cantidad de aceite en la solución inicial a digerir.

La introducción de colesterol en el proceso de micelarización de carotenoides fue la principal novedad en este estudio y, el factor de cuya interacción con el resto (*cantidad de aceite en la matriz y tipo y mezcla de carotenoides*) se derivan los cambios más significativos en la eficiencia de micelarización. La Tabla 8 muestra los resultados correspondientes a la EM observada para soluciones de licopeno y luteína sometidos al proceso de digestión *in vitro* con diferentes cantidades de colesterol y aceite. La adición de 50 mg o 150 mg de colesterol en la solución inicial a digerir, no produjo ninguna variación en los niveles de micelarización de

luteína y licopeno respecto a los obtenidos en ausencia de dicho compuesto lipofílico. De hecho, el análisis de varianza (Tabla 7) mostró que el factor *cantidad de colesterol en la matriz* no es significativo en la EM.

Tabla 8.- Efecto de la adición de colesterol y aceite en la EM de licopeno y luteína.

cantidad de colesterol (mg)	cantidad de aceite (μ L)	EM (%)	
		licopeno	luteína
50	0	29,66 \pm 1,83	3,058 \pm 0,69
50	100	4,162 \pm 0,75	5,939 \pm 0,96
150	0	27,67 \pm 1,27	2,254 \pm 0,30
150	100	4,120 \pm 0,72	10,17 \pm 1,41

Sin embargo, cuando colesterol y aceite vegetal se adicionaron inicialmente, sí se produjeron diferencias significativas respecto a los niveles de micelarización iniciales. Esto puede deberse a que las necesidades físico-químicas en cuanto a concentración de sales biliares y actividad de la lipasa pancreática, para emulsionar pigmentos y colesterol, sean muy diferentes a las necesitadas para facilitar la emulsión de ambos compuestos lipofílicos, cuando se incrementa la cantidad de aceite en la solución. Según los datos expuestos en la Tabla 8, la EM de licopeno disminuyó en presencia de colesterol y 100 μL de aceite, alcanzando valores similares con 50 mg y con 150 mg (4,16% y 4,12%, respectivamente). Esta disminución fue significativamente mayor que la observada para este pigmento con 100 μL de aceite (11,51%). El efecto opuesto se observó para luteína. La adición de colesterol, a ambos niveles, y 100 μL de aceite, incrementó significativamente su incorporación micelar en comparación a la obtenida por una solución de luteína con 100 μL de aceite sólo (3,20%). El nivel de micelarización obtenido al añadir 50 mg de colesterol y 100 μL de aceite a la solución de pigmento (5,94%) fue significativamente menor que el obtenido al adicionar al medio 150 mg de colesterol y 100 μL de aceite (10,17%). El análisis de la varianza confirmó la interacción entre los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *cantidad de colesterol en la matriz* (Tabla 7), con diferentes resultados sobre la eficiencia de micelarización en función de la polaridad del pigmento. La Figura 20 representa el efecto de los factores colesterol y presencia de aceite sobre licopeno (Figura 20a) y luteína (Figura 20b). La orientación y forma de las curvas difiere para cada pigmento, puesto que la interacción entre los factores tiene consecuencias sinérgicas pero de sentido contrario para cada uno de ellos.

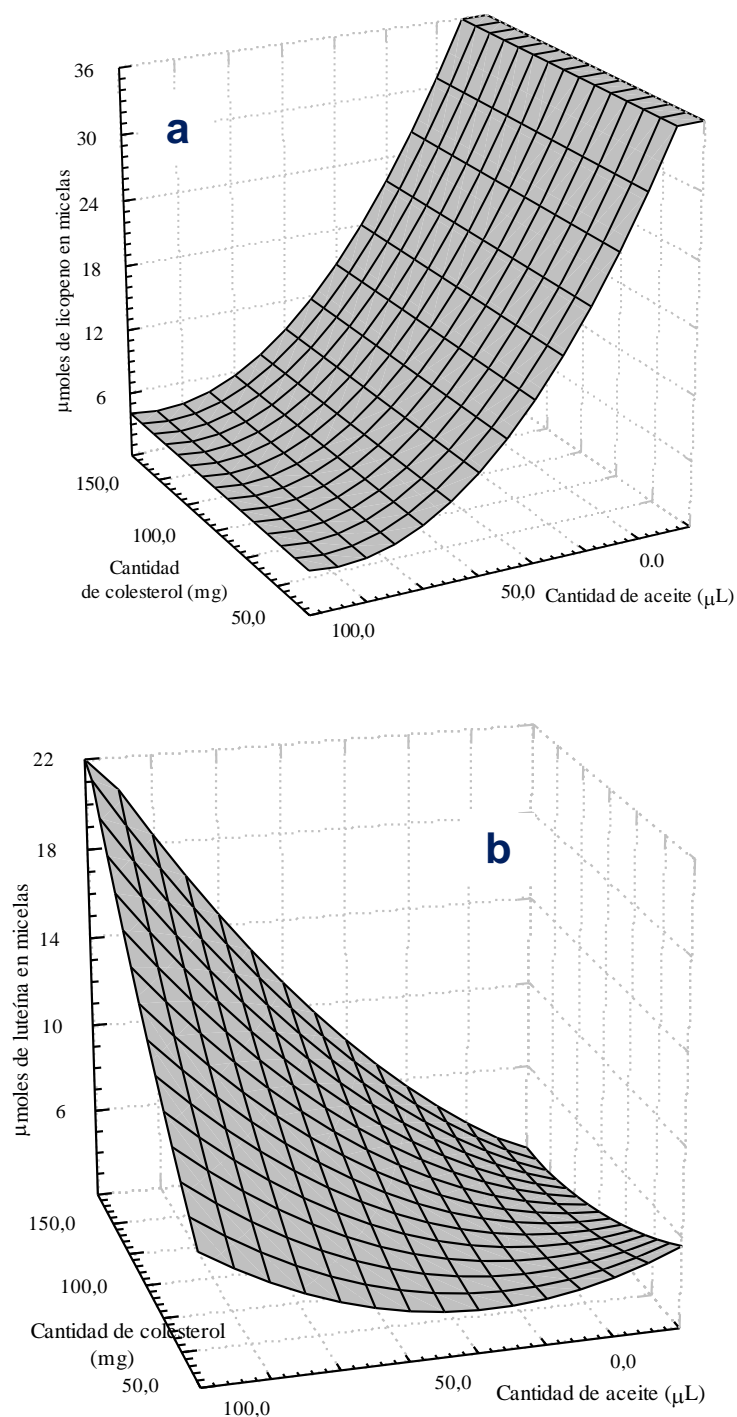


Figura 20.- Representación de la superficie-respuesta de licopeno **(a)** y luteína **(b)** en los experimentos de micelarización con la adición de distintas cantidades de aceite y colesterol.

La interacción entre los factores *cantidad de aceite en la matriz* y *cantidad de colesterol en la matriz*, y su diferente efecto sobre la micelarización de xantofilas y carotenos podría deberse a diversas razones. Hay que tener muy en cuenta la localización de colesterol en las micelas para poder dar una explicación a los resultados obtenidos. Como consecuencia de su carácter débilmente polar, tiende a solubilizarse en el centro de las micelas, donde interaccionan las regiones hidrofóbicas de ácidos biliares y fosfolípidos. Por lo tanto, una adición de colesterol a la solución inicial de carotenoide a digerir puede causar un desplazamiento de los carotenoides que se incorporan en el interior de las micelas debido a sus características hidrofóbicas, como es el caso de licopeno. El nivel de micelarización de un pigmento apolar se minimizaría incorporándose preferentemente colesterol y triglicéridos a las micelas, implicando por tanto una incorporación competitiva. Una segunda razón podría deberse a un aumento de la rigidez del centro de las micelas debida al colesterol, que formaría una barrera que impediría el paso de carotenos al interior de las micelas. Un efecto similar se ha observado en la incorporación micelar de carotenos a membranas celulares con un alto contenido en colesterol (Lancrajan y colaboradores, 2001). Socaciu y colaboradores (2000), también demostraron que la incorporación de β -caroteno a liposomas enriquecidos con colesterol fue mucho menor que la cantidad incorporada cuando el caroteno se añadió a liposomas libres de colesterol. Para las xantofilas la situación es diferente, se localizan en la zona más externa de las micelas debido a la polaridad que le proporciona los grupos hidroxilo de su estructura. Estos grupos funcionales también facilitan una orientación diferente del pigmento en las micelas que incrementa su agregación próxima a fosfolípidos y sales biliares. En este caso la presencia inicial de colesterol en la matriz favorece la incorporación de compuestos polares que se sitúan en la zona más externa de las micelas.

Las diferencias físico-químicas de los carotenoides (consecuencia de sus características estructurales), origina la necesidad de un entorno lipofílico distinto para facilitar la emulsión de estos pigmentos y su posterior incorporación micelar. La modificación en la composición de la matriz lipofílica causa cambios cualitativos y cuantitativos en la eficiencia de micelarización, en función de la clase de pigmento, subrayando la interacción entre colesterol y presencia de

aceite como los factores que modifican sustancialmente las características lipofílicas del medio donde tiene lugar la micelarización de carotenoides.

Eficiencia de la hidrólisis enzimática sobre ésteres de luteína y su incorporación micelar

Como particularidad estructural de las xantofilas hidroxiladas, la esterificación supone un incremento de la apolaridad de la xantofila respecto a su correspondiente forma libre, lo que modifica completamente su comportamiento durante la fase de micelarización así como los requerimientos físico-químicos del proceso digestivo (composición de la matriz lipofílica, enzimas y sales biliares) para aumentar la EM, haciendo un énfasis especial en el hecho de que las xantofilas esterificadas tienen que ser hidrolizadas para que se absorban eficientemente por los enterocitos (ver página 42). Cuando se han expuesto los resultados sobre la EM de ésteres de luteína y los factores que la modulan, no se ha mencionado el estado, si libre o esterificado, en el que dicho pigmento se incorpora a micelas y por tanto en el que es potencialmente bioaccesible a las células del epitelio intestinal. En la Figura 21 se representa el cromatograma correspondiente al análisis por HPLC de un extracto carotenoide obtenido tras someter al proceso de digestión *in vitro* a una disolución de ésteres de luteína, (sin separar la fracción micelar). La mayor parte de luteína se mantiene en su forma esterificada y sólo un 1% es eficientemente hidrolizado por la lipasa pancreática que se añade durante la fase intestinal de la digestión *in vitro*. Se confirma la escasa afinidad de la lipasa pancreática sobre los ésteres xantofílicos, hecho ya apreciado por Breithaupt y colaboradores (2002b). Este grupo de investigación demostró que la lipasa pancreática humana no hidroliza de forma eficiente a los ésteres de xantofilas como β -criptoxanteno, zeaxanteno, luteína y capsanteno, mientras que la lipasa pancreática porcina y la lipasa de *Candida rugosa* sí mostraron una cierta actividad sobre dichos ésteres, aunque la eficiencia no llegue a ser significativa.

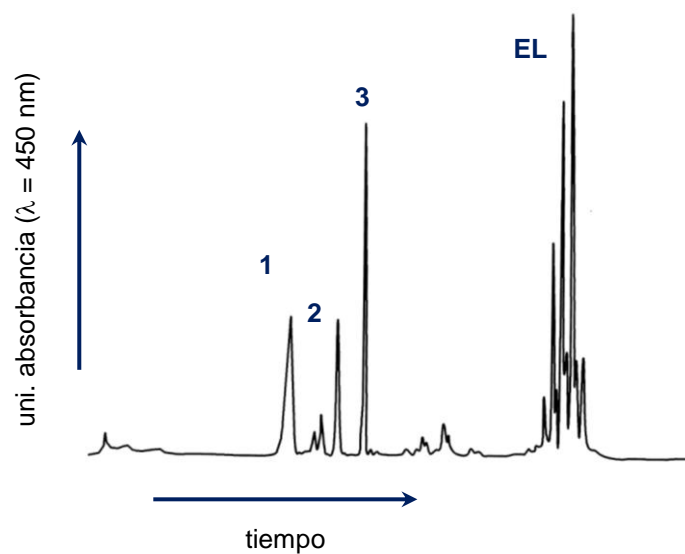


Figura 21.- Cromatograma correspondiente al análisis por HPLC de un extracto carotenoide obtenido tras someter al proceso de digestión *in vitro* a una disolución de ésteres de luteína, (sin separar la fracción micelar). **1**, luteína libre; **2**, isómeros de luteína libre; **3**, patrón interno; **EL**, ésteres de luteína.

Ante la escasa afinidad de la lipasa pancreática por los ésteres de xantofilas, se han propuesto varias modificaciones en el modelo de digestión *in vitro* para aumentar el grado de hidrólisis de las xantofilas, entre ellas la incorporación de co-lipasa al pool enzimático que se añade durante la fase intestinal del modelo. La eficiencia de esta modificación ha sido comprobada en el presente estudio. En el proceso de digestión de ésteres de luteína se introdujo una mezcla de lipasa y co-lipasa en relación equimolar. El enzima co-lipasa aumenta la actividad de la lipasa al eliminar la acumulación de fosfolípidos, ácidos grasos y monoglicéridos en la interfase y reducir la inhibición causada por las sales biliares (Momsen y Brockman, 1976; Borgström y colaboradores, 1984). Por tanto, se espera que al incorporar los dos enzimas, aumente la actividad hidrolítica. Aplicando el método de Lehner y Verger (1997) se comprobó el aumento de actividad hidrolítica con la incorporación de co-lipasa. En la Figura 22 se representa la cantidad de p-nitrofenol producido tras la hidrólisis de su éster (p-nitrofenilpalmitato) por la acción de lipasa o el par lipasa/co-lipasa. Se aprecia que la cantidad de p-nitrofenol es significativamente mayor cuando se añade co-lipasa a la suspensión enzimática. Las actividades, expresadas como μmol de p-nitrofenol formado por mg de proteína y minuto (U) fueron $4,81 \times 10^{-4}$ U (lipasa pancreática) y $8,58 \times 10^{-4}$ U (par lipasa/co-lipasa). A pesar de este aumento de actividad, cuando se realizó el ensayo de digestión *in vitro* de ésteres de luteína adicionando el par enzimático, no se observó un aumento en la cantidad de luteína hidrolizada (Tabla 9). Los valores obtenidos no difieren significativamente respecto a los observados usando sólo la suspensión de lipasa pancreática. La actividad del par enzimático lipasa/co-lipasa y del enzima lipasa, medida sobre ésteres de luteína fue de $5,9 \times 10^{-6}$ U (μmol de luteína libre obtenido por mg de proteína y minuto), dato similar al obtenido en el estudio de Breithaupt y colaboradores (2002b). La dificultad del proceso hidrolítico de ésteres de xantofilas no radica, por tanto, en una baja actividad del enzima sino más bien en la elevada estereoespecificidad del mismo, que dificulta su reacción con estos extractos xantofílicos.

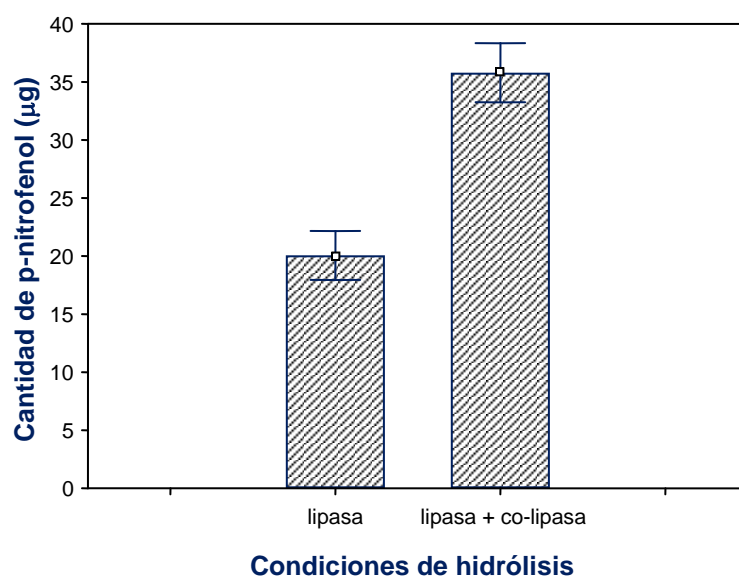


Figura 22.- Actividad hidrolítica del enzima lipasa o del par lipasa/co-lipasa (en mezcla equimolar) determinada según el método de Lehner y Verger (1997).

Otra posible modificación del modelo de digestión *in vitro* sería introducir al enzima responsable del proceso hidrolítico de ésteres de varios compuestos entre ellos las xantofilas, modificación que se ha introducido en recientes trabajos (Granado-Lorencio y colaboradores, 2007). Como se ha mencionado en la introducción, el enzima que muestra mayor afinidad por los ésteres de xantofilas es la carboxil-éster lipasa. En el estudio de Breithaupt y colaboradores (2002b), se incluyó a este enzima en el proceso digestivo *in vitro*, mostrando la mayor eficiencia de hidrólisis, siendo más alta sobre extractos de papaya y loquat que sobre oleorresinas de marigold y pimentón. Sin embargo, en este trabajo no se determinó si el escaso porcentaje de xantofila hidrolizada se incorporaba a la fracción micelar y si la fracción, remanente pero mayoritaria, de xantofila esterificada participaba del proceso de micelarización, extremos que se han verificado en el presente estudio. Los análisis por HPLC de los extractos carotenoides obtenidos a partir de la fracción micelar procedente del proceso de digestión *in vitro* de ésteres de luteína son cualitativamente muy similares al cromatograma de la Figura 21, ya que aparecen señales correspondientes a luteína libre y esterificada. Las cantidades de luteína hidrolizada y esterificada que son micelarizadas, tras completar el proceso de digestión *in vitro*, se exponen en la Tabla 9. Del análisis de la fracción micelar después de la hidrólisis de ésteres de luteína, se pueden obtener dos deducciones significativas. Primero, aunque los ésteres de luteína no fueron eficientemente hidrolizados por la lipasa pancreática porcina, la cantidad que se hidrolizó fue totalmente incorporada a las micelas, convirtiéndose así en sustratos potencialmente disponibles para las células epiteliales del intestino delgado. Segundo, los ésteres de luteína también están presentes en la fracción micelar, y como se ha expuesto en la introducción (ver página 42) la mayor parte de la actividad del enzima carboxil-éster lipasa se localiza en la membrana de las células del epitelio intestinal, por lo que para que este enzima pueda actuar sobre los sustratos, es necesario que éstos se incorporen previamente a las micelas, que serán las encargadas de transportarlos hasta la membrana de las células epiteliales. La presencia de ésteres de luteína en las micelas asegura su presencia, en la membrana del enterocito, donde se realizará su hidrólisis y posterior absorción.

Tabla 9.- Eficiencia de la micelarización de ésteres de luteína, distinguiendo forma libre o hidrolizada, y forma esterificada según diferentes condiciones de digestión *in vitro*.

condiciones de hidrólisis	EM (%)	
	luteína hidrolizada	ésteres de luteína
100 μ L suspensión de lipasa	1,14 \pm 0,21	1,69 \pm 0,13
100 μ L suspensión de lipasa y co-lipasa ¹	1,22 \pm 0,38	1,81 \pm 0,23
100 μ L suspensión de lipasa+100 μ L aceite vegetal	1,04 \pm 0,67	5,91 \pm 0,77

¹ Mezcla equimolar

Cabe entonces plantearse si la modificación, llevada a cabo en recientes estudios, de introducir el enzima carboxil-éster lipasa durante la fase de digestión intestinal es acertada puesto que la actividad se ejercerá sólo sobre el material que se ha micelarizado (no durante la micelarización), y una vez que éste alcance la pared del epitelio y se difunda el contenido micelar (el enzima no actuaría sobre las micelas).

Estimación de la digestibilidad de β -caroteno desde materias grasas para untar.

Aplicación del modelo de digestión *in vitro*

Hasta el momento, con el modelo de digestión *in vitro* se ha estimado la EM de una disolución carotenoide (o mezcla) en una matriz oleosa, a la que se han añadido componentes en distintas proporciones para estimar su efecto en la EM de un experimento control. En cierto modo se estaba aplicando un modelo de digestión *in vitro* a una disolución oleosa también *modelo* o, definiéndola quizás desde un punto de vista más crítico, *artificial*. En la siguiente exposición de resultados se tratará la aplicación del proceso de digestión *in vitro*, como herramienta analítica, a un alimento real, en este caso materias grasas para untar, que en definitiva no dejan de ser matrices de carácter y composición oleosa. De esta forma se obtendrán datos de EM en distintos tipos de mantequilla o margarina, EM de mayor o menor valor en función de la presencia de algún ingrediente interferente o complementario del proceso de micelarización. El pigmento carotenoide omnipresente en las mantequillas y margarinas es β -caroteno. Los fabricantes consiguen con su adición una doble finalidad: 1, proporcionar la tonalidad pajiza al producto y 2, contribuir al valor nutricional de este alimento debido a la actividad como provitamina A que tiene β -caroteno. La ola de *alimentos saludables* o funcionales también ha alcanzado a las mantequillas y margarinas y en los lineales de los mercados se puede encontrar una amplia variedad de estos productos, diseñados con ingredientes añadidos con los que el fabricante alega unos beneficios saludables en su etiquetado. La legislación española es en este aspecto muy clara ya que está prohibido vender productos que hagan referencia a la prevención o tratamiento de enfermedades porque entonces no se trataría de alimentos sino de medicamentos. Las organizaciones de consumidores recomiendan leer las etiquetas con criterio flexible, teniendo en cuenta las

ventajas e inconvenientes de los preparados alimentarios con propiedades funcionales. Así, un alimento que contiene fitoesteroles se puede publicitar como reductor de la absorción de colesterol, pero hay que considerar que esto implicaría también una disminución en la incorporación de otros compuestos liposolubles como los carotenoides (esenciales en muchas funciones biológicas), con lo cual hay que buscar una relación de consenso (dieta equilibrada) para no entrar en riesgo con otros aspectos de la salud. La estimación de la EM de β -caroteno proporcionará una medida de la digestibilidad de provitamina A que se puede esperar del consumo de este tipo de productos y el efecto que la adición de esos ingredientes (extra, funcionales, bioactivos pero añadidos) puede tener en la EM de este compuesto liposoluble.

El estudio se centró en diversas mantequillas y margarinas comercializadas en España, que suelen adicionar dicho pigmento como colorante o como precursor de vitamina A. La legislación española autoriza el uso de β -caroteno sin límites para colorear mantequillas y margarinas (Real Decreto 485/2001, BOE 22/05/2001). La mantequilla es un producto graso obtenido exclusivamente de leche o nata de vaca. Las margarinas en cambio, son grasas semisólidas con aspecto similar a la mantequilla pero más untuosas.

En la Tabla 10 se presentan los datos correspondientes a la cantidad de vitamina A, expresada como equivalentes de retinol (ER) según consta en la etiqueta de cada materia grasa usada en el estudio. También se indica el contenido en β -caroteno de cada muestra, según las determinaciones realizadas en nuestro laboratorio. Se puede apreciar que de las muestras en cuya etiqueta no consta la presencia de β -caroteno (M1, M6 y M8) sólo en una (M6) no se detectó la presencia de este caroteno. El resto de muestras presenta una cantidad de β -caroteno apreciable y próxima o muy próxima al valor declarado de ER (salvo la muestra M8 y la ya mencionada M6). Este hecho puede inducir a la confusión de que parte o toda la cantidad de retinol no se encuentre como tal, sino como provitamina A, hecho que no se menciona en la etiqueta del producto ya que no existe obligación a ello. En el hipotético caso de que esta suposición sea cierta (no se ha verificado este extremo experimentalmente), y considerando que la equivalencia de β -caroteno a retinol es 2:1, en alimentos grasos (FAO/WHO, 1998), no se cumplirían los porcentajes de CDR que aporta la ingesta de 100

gramos de producto según consta en el etiquetado sino la mitad, siempre y cuando supongamos que la eficiencia de las etapas de absorción (digestibilidad y asimilación) sean máximas, hecho del cual probablemente el lector ya dude. Son precisamente estas dos aclaraciones (1, si retinol está presente en el producto como tal o el valor de vitamina A se refiere al compuesto provitamínico β -caroteno, y 2, la no equivalencia directa entre retinol y β -caroteno en el cálculo de ER) las que serían necesarias para completar el etiquetado del producto.

En esa misma tabla también se exponen los datos de la cantidad de β -caroteno incorporado a micelas, expresada en microgramos de β -caroteno por cada 100 gramos de producto digerido, según las condiciones de digestión *in vitro* expuestas en la sección de Materiales y Métodos. De la digestión de las muestras M1, M3, y M8 no se produjo incorporación de β -caroteno a la fracción micelar mientras que se observó una incorporación relativamente baja en el caso de la muestra M2 (4 μ g de β -caroteno/100 g) y para el resto de muestras se obtuvieron valores similares de micelarización (20 μ g de β -caroteno/100 g).

La EM de β -caroteno es pequeña con valores en un rango del 0,5 al 4%. Olson (1994) indica un valor máximo de eficiencia en la absorción de carotenoides del 30%. Varios estudios de bioaccesibilidad *in vivo* de β -caroteno, indican valores diversos según el tipo de alimento utilizado en el estudio, pero que son siempre superiores al valor de digestibilidad aquí encontrado (6%-34%). Hay que destacar que estos valores se corresponden con la bioaccesibilidad, que comprende la etapa de micelarización (digestibilidad) y la etapa de asimilación.

Tabla 10.- Composición media y cantidad de β -caroteno micelar por cada 100 gramos de producto en las materias grasas para untar utilizadas en el estudio.

	Declarado por el fabricante				Valores experimentales	
	Grasa (g)	Esteroles (g)	Fibra (g)	ER (μ g)	β -caroteno (μ g) ¹	β -caroteno micelar (μ g) ²
M1	32	8	- ³	800	587	ND ⁴
M2⁵	35	7,5	-	800	840	3,78
M3⁵	41	-	2	-	411	ND
M4⁵	40	-	-	560	512	21,7
M5⁵	41	-	-	275	621	18,4
M6	55	-	-	600	ND	NE ⁶
M7⁵	60	-	-	800	753	19,7
M8	73	-	-	751	237	ND

¹ Microgramos de β -caroteno por cada 100 gramos de producto según determinación experimental.

² Microgramos de β -caroteno incorporado a micelas por cada 100 gramos de producto según determinación experimental.

³ Ausente.

⁴ ND, no detectado.

⁵ En la etiqueta consta el uso de β -caroteno como colorante añadido.

⁶ NE, no efectuado al no contener β -caroteno en la muestra original.

Pero, la eficiencia determinada en este estudio se corresponde sólo con la etapa de digestibilidad con lo que es de suponer que la bioaccesibilidad de β -caroteno a partir de las materias grasas utilizadas en este estudio será inferior. A continuación se consideran aquellos constituyentes de la matriz alimentaria que pueden haber limitado la incorporación de β -caroteno desempeñando un rol de compuestos interferentes.

Fitoesteroles

Según el etiquetado, las muestras M1 y M2 contienen 8 y 7,5 gramos de fitoesteroles por cada 100 gramos de producto. A pesar del contenido significativo de β -caroteno inicial, la digestibilidad de éste fue de las más bajas (nula en el caso de M1 y 3,78 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ para M2). El hecho de que la presencia de fitoesteroles en la ingesta disminuye sensiblemente la absorción de colesterol, es conocido, al interferir en la solubilización y micelarización de éste (De Jong y colaboradores, 2003; Rozner y Garti, 2006). Los fitoesteroles actúan como interferentes en el proceso de micelarización desplazando a los compuestos liposolubles que necesitan incorporarse a micelas para poder ser transportados de forma eficiente al epitelio intestinal. Para las vitaminas liposolubles y carotenoides, esta interferencia representa una desventaja ya que se evita la incorporación de estos compuestos de propiedades beneficiosas para la salud (Quilez y colaboradores, 2003). Por ello se recomienda controlar la ingesta de alimentos enriquecidos en fitoesteroles en aquellos grupos de población con necesidades nutritivas elevadas (niños y adolescentes, que están en período de crecimiento, embarazadas, madres lactantes y personas que sufren de alteraciones en el aparato digestivo, atletas, etc).

Fibra

La muestra M3 indica en su etiquetado la presencia de 2 gramos de fibra por cada 100 gramos de producto. Los resultados obtenidos nos indican una digestibilidad nula del β -caroteno que contiene. Varios estudios anteriores ya habían observado el efecto negativo de la fibra en la absorción de carotenoides (Riedl y colaboradores, 1999). La fibra va a actuar como interferente en la formación de micelas, hecho que resulta imprescindible para el transporte de componentes liposolubles desde la matriz alimentaria a la pared del epitelio. En este caso no se trata de un desplazamiento de compuestos como en el caso de los fitoesteroles sino que la

formación de micelas no tiene lugar, o bien éstas no están lo suficientemente estabilizadas y tienden a disgregarse. La fibra forma enlaces con los ácidos biliares, imprescindibles en el proceso de micelarización, ralentiza el proceso de difusión desde la matriz formando geles que en definitiva evitan la formación de micelas y la transferencia de compuestos liposolubles a las mismas.

Grasa

La grasa es el factor clave en la digestibilidad de carotenoides. Tanto la cantidad como el tipo de grasa presente en la matriz delimitan la eficiencia de la digestibilidad de estos compuestos. En estudios anteriores se ha comprobado que se necesita una mínima cantidad de grasa para asegurar la incorporación de carotenoides a micelas ya que facilita la transferencia desde la matriz alimentaria, solubilizando a los carotenoides en glóbulos lipídicos, y posteriormente, participan en la formación de las micelas. Se ha establecido la cantidad mínima de grasa que se requiere (3 a 6 gramos) para alcanzar una eficiente digestibilidad de carotenoides (van het Hof y colaboradores, 2000). También se ha comprobado que un aumento en la cantidad de grasa ingerida no implica un aumento en la digestibilidad de carotenoides e incluso puede llegar a ser interferente (Roodenburg, 2000; resultados del presente estudio). Los datos obtenidos indican una digestibilidad muy similar en muestras con diferente contenido en grasa (exceptuando a las muestras comentadas M1, M2 y M3 que contienen otros componentes interferentes). Esta afirmación se verifica en las muestras M4, M5, y M7 en las que se alcanzó una cantidad de β -caroteno micelar muy parecida, quizás con tendencia a disminuir a medida que aumenta el contenido graso, pero las diferencias no llegan a ser significativas. Sin embargo, para la muestra M8, la de mayor contenido graso, no se observó la incorporación de β -caroteno a las micelas. Es cierto que esta muestra, a excepción de la muestra M6, es la de menor contenido en β -caroteno (237 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) pero este hecho no debería haber supuesto ningún impedimento. Más bien, es el elevado contenido en grasa el que debe haber desempeñado un papel negativo por las siguientes causas. Un alto contenido en grasa puede impedir una eficiente solubilización desde la matriz a los glóbulos lipídicos y posteriormente a las micelas saturando de material lipídico la composición de éstas y

desplazando a β -caroteno. Una segunda posible causa es la cantidad necesaria de sales biliares y enzimas hidrolíticas para digerir una matriz de alto contenido graso. En estos ensayos, las condiciones de digestión se han mantenido constantes (el modelo de digestión es de tipo estático), por lo que es posible que se haya producido un descenso en la eficiencia de la micelarización debido a una escasa digestión de la matriz. Por tanto parece que una matriz de elevado contenido graso no facilita, en las condiciones de digestión ensayadas, la micelarización del β -caroteno que contiene, o requiere de unas condiciones de digestión adaptadas a esa composición.

Enriquecimiento de las matrices con β -caroteno y efecto en la digestibilidad

A la vista de los resultados de digestibilidad de β -caroteno obtenidos con las muestras originales, y considerando la escasa incorporación a micelas, se planteó si un incremento en la cantidad de β -caroteno inicialmente presente en la matriz produciría un aumento en la cantidad de β -caroteno micelar, compensando en parte el efecto negativo que los compuestos interferentes ejercen en su digestibilidad. Para ello una sub-muestra de cada materia grasa en estudio se enriqueció con β -caroteno hasta alcanzar una concentración de 50 μg de β -caroteno/g de producto. Tras someter cada matriz enriquecida al proceso de digestión se calculó la cantidad de β -caroteno micelar, datos que se presentan en la Tabla 11. En todos los casos se observó un incremento en la cantidad de β -caroteno micelar, incluso en aquellas muestras en las que originalmente éste no se incorporó a las micelas a pesar de que la matriz sí lo contenía (M1, M3 y M8). En el caso de la muestra M6, sin β -caroteno en la matriz original, se produjo una incorporación eficiente de β -caroteno desde la matriz enriquecida. Un aumento del contenido de β -caroteno en la matriz, supone por tanto un aumento en la cantidad de β -caroteno micelar. Sin embargo, este hecho no implica que el enriquecimiento suponga una mejora cualitativa de la digestibilidad, puesto que los factores de la matriz siguen interfiriendo en la incorporación de β -caroteno a las micelas. Para constatar este argumento, se calculó la EM (datos indicados entre paréntesis en la Tabla 11). Así, en el caso de la muestra M2 se alcanzó una eficiencia del 0,45% y 0,41% en la matriz original y enriquecida, respectivamente. Es decir, un aumento de la cantidad de β -caroteno en la matriz, supone un aumento de la

cantidad de β -caroteno micelar pero la eficiencia es la misma, lo que indica que el enriquecimiento con β -caroteno no es la estrategia más adecuada para aumentar la EM desde esta matriz ya que se estaría desaprovechando gran parte del β -caroteno añadido. Esta situación se reproduce en las muestras M4, M5 y M7. El caso particular de la muestra M4 es llamativo por el descenso significativo en la eficiencia de la digestibilidad que supone el enriquecimiento con β -caroteno de la matriz, máxime cuando en ésta no existen factores interferentes (fitoesteroles y/o fibra). Al mantenerse constantes las condiciones de digestión es posible que se haya producido un descenso en la EM debido a una menor digestión de la matriz. Distinta es la consideración de las muestras M1, M3 y M8 que a pesar de presentar β -caroteno en la matriz original, éste no se incorporó. Cuando se realizó el experimento con estas matrices, enriquecidas con β -caroteno se observó que éste se incorporaba, pero obteniendo valores similares de eficiencia a los de las muestras M4, M5 y M7. Se puede concluir entonces que el enriquecimiento de β -caroteno de esas matrices (M1, M3, M8) no supone un salto cualitativo en la eficiencia de la micelarización. Tampoco lo es en el caso de la muestra M6, que no contiene β -caroteno originalmente. El enriquecimiento, estrictamente *adición* en esta muestra, sí produjo la incorporación de β -caroteno a micelas alcanzando la mayor EM de todas las muestras analizadas (4,83%).

Con los resultados obtenidos se puede indicar que ninguna de las materias grasas analizadas representa un vehículo idóneo para la digestibilidad de β -caroteno considerando la baja eficiencia alcanzada en la micelarización. Varias muestras presentan diversos componentes claramente interferentes en el proceso de micelarización como fitoesteroles y fibra. Estos compuestos limitan extraordinariamente la digestibilidad de componentes liposolubles como los carotenoides llegando a impedir en algunos casos su micelarización. Por último, el enriquecimiento de estos productos como estrategia para aumentar la digestibilidad de β -caroteno no es lo más adecuado, ya que la presencia de compuestos interferentes continúa siendo determinante en la eficiencia del proceso.

Tabla 11.- Cantidad de β -caroteno micelar por cada 100 gramos de producto digerido partiendo de la matriz original (MO) o la matriz enriquecida (ME) con 50 μg de β -caroteno/gramo de producto.

	β -caroteno micelar. MO (μg) ¹		β -caroteno micelar. ME (μg) ¹	
M1	ND ²	-	63,0	(1,38) ³
M2⁴	3,78	(0,45)	19,5	(0,41)
M3⁴	ND	-	82,4	(1,81)
M4⁴	21,7	(4,24)	115,5	(2,78)
M5⁴	18,4	(2,96)	137,6	(2,62)
M6	NE ⁵	-	147,0	(4,83)
M7⁴	19,7	(2,61)	97,8	(2,00)
M8	ND	-	60,8	(2,14)

¹ Microgramos de β -caroteno por cada 100 gramos de producto según determinación experimental.

² ND, no detectado.

³ Eficiencia de la micelarización (%).

⁴ En la etiqueta consta el uso de β -caroteno como colorante añadido.

⁵ NE, no efectuado al no contener β -caroteno en la muestra original.

Selección y optimización de la composición de una emulsión O/W que maximice la digestibilidad de carotenoides

El estudio realizado sobre la digestibilidad de β -caroteno desde materias grasas para untar, y los resultados en él obtenidos, conducen a una reflexión que se puede exponer desde dos puntos de vista. Realizando un análisis dirimente, utilizando el modelo experimental de digestión *in vitro* se puede sugerir que las matrices lipofílicas si bien son necesarias para asegurar la eficiencia de la micelarización y posteriormente la captación de compuestos lipofílicos bioactivos como los carotenoides, no son las más adecuadas para maximizar la EM. La formulación de unas materias grasas permite una EM superior a otras pero en ningún caso se llega a valores importantes o de referencia (30% según Olson, 1994). Pero si detenemos el análisis aquí quizás se está obviando la parte más interesante del estudio, que es realizar una reflexión de carácter constructivo y desde un punto de vista intervencionista. ¿Cómo aumentar la EM de carotenoides? Las características de la herramienta analítica que se ha utilizado en el estudio, que mimetiza el proceso digestivo, indican el camino. Gran parte del esfuerzo físico y químico del proceso digestivo se invierte en emulsionar la fracción lipídica de los alimentos ingeridos, micelarizarla y conducirla a la proximidad de la pared epitelial. Para facilitar el proceso de transferencia hasta la fracción micelar, lo más conveniente sería partir de una matriz hidrofílica en la que el material lipofílico de interés estuviera emulsionado. Esta alternativa se había expuesto en los antecedentes bibliográficos (Richelle, 2002; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2004). Este tipo de formulaciones presentan varias ventajas para el consumidor, permiten la combinación selectiva de varios compuestos funcionales y en la concentración adecuada y, aplicando el criterio de diseño necesario, podrían aumentar la asimilación de dichos compuestos. El criterio de diseño adecuado es el de medir o determinar la EM puesto que no todos los agentes emulgentes facilitarán la transferencia del compuesto lipídico a las micelas. Y es aquí donde de nuevo se utiliza la herramienta analítica del modelo de digestión *in vitro* para llegar a la formulación adecuada, utilizando también el planteamiento experimental adecuado. Quizás el primer objetivo de este estudio tenía un marcado carácter de *observación experimental* mientras que el segundo necesita de un mayor esfuerzo creativo.

Como se expuso en la sección de Materiales y Métodos, la consecución de este objetivo se realizó en dos etapas de experimentación. De igual forma la exposición de resultados y discusión responde a esas dos etapas.

Fase de barrido experimental: detección de factores críticos

En esta fase se trataba de identificar aquellos factores (emulgentes) que producen un efecto relevante en la respuesta, es decir, maximizan la EM del perfil carotenoides presente en la matriz hidrofílica. Los resultados obtenidos tras la aplicación del diseño experimental aplicado (SL) en la primera fase se muestran en la Tabla 12, mientras que los correspondientes coeficientes de regresión estimados por el método de los mínimos cuadrados se exponen en la Tabla 13. Los emulgentes empleados en este estudio, desde el punto de vista de su estructura química, se pueden clasificar en tres grupos diferentes; ésteres de sacarosa o lipoazúcares (EMF-1, EMF-2 y EMF-3), acilglicéridos (EMF-4, EMF-5, EMF-7 y EMF-8), y poliacylglicéridos (EMF-6 y EMF-9).

Antes de comentar los resultados obtenidos en este apartado, se debe realizar una breve reflexión. Tradicionalmente, en una investigación científica se aplica un nivel de confianza del 95% con un 5% de probabilidad de error (nivel de significación, $p < 0,05$), pero esto es un criterio convencional. En esta fase de barrido, si se tiene en cuenta ese nivel de significación, ninguno de los factores examinados podría ser considerado como crítico ya que no presentan un nivel de significación, p , inferior a 0,05 (Tabla 13). Sin embargo, diversos estudios han aplicado en experimentos de detección de factores críticos un criterio diferente, considerando un nivel de confianza del 85% con un nivel de significación, p , inferior a 0,15 (Rincón y colaboradores, 2003; Periago y colaboradores, 2004). Aún así tan solo uno de los factores analizados en el presente estudio cumpliría con este criterio (Tabla 13, término número 28, $3x4$, -374,7, $p = 0,08$).

El análisis de regresión de los datos experimentales, indican que el modelo cuadrático es el que mejor ajuste presenta aunque no llega a ser significativo (grados de libertad 54, $F = 2,05$, $p = 0,1065$). Las cantidades de R^2 y R^2_{adj} se corresponden con 0,918 y 0,474, respectivamente. Existe por tanto un elevado *ruido* experimental y de hecho, la precisión adecuada alcanza un valor de 5,412, ligeramente superior a 4.

Parece difícil aplicar este criterio para reducir el modelo experimental y eliminar aquellos factores no críticos en la respuesta. Pero se puede utilizar un sistema de reducción del modelo más obvio, eliminando aquellos términos de acuerdo a otro criterio estadístico (Cornell, 2002b). Así, el criterio que se seguirá para la reducción del modelo consistirá en atender al valor absoluto del término asociado a cada factor, seleccionando aquellos factores que presenten un valor absoluto elevado. Como además el objetivo es maximizar la respuesta (EM), se atenderá a los factores e interacciones que presenten un valor de su coeficiente de participación en el modelo elevado y positivo. Antes de realizar el análisis numérico de los resultados expuestos en la Tabla 13, para seleccionar los componentes más adecuados para la fase de optimización, se realizará un estudio del efecto de cada componente en la respuesta (EM) combinando los datos experimentales de la Tabla 12 con los valores de los coeficientes de la Tabla 13.

Tabla 12.- Datos experimentales de la EM obtenidos a partir de la aplicación del diseño experimental (SL).

prueba	emulgente ¹									agua	EM (%)
	EMF-1	EMF-2	EMF-3	EMF-4	EMF-5	EMF-6	EMF-7	EMF-8	EMF-9		
1	0	5	0	0	3,3	0	5	0	0	86,7	8,00
2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	95	4,27
3	5	5	5	0	0	0	0	0	5	80	9,22
4	5	0	5	0	5	0	0	5	0	80	12,1
5	5	5	0	5	0	0	0	5	0	80	5,08
6	0	5	0	5	5	5	0	0	0	80	7,59
7	0	0	3,3	1,7	0	5	5	0	5	80	11,2
8	5	5	0	0	5	5	0	0	0	80	2,83
9	5	0	0	0	5	5	5	0	0	80	3,39
10	0	0	5	2,5	5	0	0	0	0	87,5	13,6
11	0	5	5	5	5	0	0	0	0	80	8,59
12	0	0	0	0	5	0	5	5	5	80	17,3
13	5	0	0	0	0	5	0	5	5	80	9,60
14	0	0	0	5	5	2,5	0	2,5	5	80	9,73
15	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	98,3	7,15
16	0	0	5	0	5	5	0	0	5	80	9,68
17	0	0	2,5	2,5	5	5	0	5	0	80	8,49
18	0	3,3	0	5	1,7	0	5	0	5	80	12,0
19	0	0	5	0	5	5	0	0	5	80	13,2
20	0	5	5	0	0	5	0	5	0	80	9,75
21	0	5	0	5	0	5	0	0	5	80	3,21
22	0	0	0	5	5	2,5	0	2,5	5	80	16,4
23	0	2,5	5	0	0	2,5	5	0	5	80	14,5
24	5	5	0	0	0	5	5	0	0	80	7,70
25	5	0	5	0	0	0	5	5	0	80	4,00
26	5	0	0	5	0	0	0	0	0	90	12,2
27	0	5	0	2,5	0	0	0	0	5	87,5	4,16
28	5	0	5	5	0	5	0	0	0	80	4,18
29	0	5	0	0	5	0	5	0	5	80	6,91
30	0	0	0	5	0	5	5	5	0	80	1,72
31	5	0	0	0	0	5	0	0	0	90	6,79
32	0	0	5	0	1,7	5	1,7	3,3	3,3	80	16,7
33	0	0	0	0	5	0	0	0	5	90	8,98
34	0	0	0	0	0	5	3,3	5	0	86,7	6,50
35	5	5	0	0	2,5	2,5	0	0	5	80	7,08
36	0	0	5	5	2,5	0	2,5	0	5	80	15,4
37	0	2,5	5	0	0	0	0	5	0	87,5	9,06

continúa en la página siguiente...

Tabla 12.- (Cont.) Datos experimentales de la EM obtenidos a partir de la aplicación del diseño experimental (SL).

prueba	emulgente ¹									agua	EM (%)
	EMF-1	EMF-2	EMF-3	EMF-4	EMF-5	EMF-6	EMF-7	EMF-8	EMF-9		
38	0	0	5	5	0	0	0	5	5	80	6,86
39	0	5	0	5	0	0	0	5	0	85	11,4
40	5	0	0	0	5	0	0	3,3	0	86,7	17,3
41	0	0	0	5	5	0	5	5	0	80	16,3
42	0	5	0	0	0	0	5	5	5	80	15,8
43	3,3	5	1,7	0	0	0	1,7	5	3,3	80	9,37
44	1,7	0	0	3,3	1,7	5	0	5	3,3	80	14,1
45	0	0	5	5	0	5	0	0	0	85	10,3
46	0	5	0	0	5	0	0	5	5	80	11,4
47	5	0	5	0	0	0	0	0	0	90	12,2
48	5	5	0	0	0	0	0	0	0	90	5,82
49	0	0	0	0	0	0	5	0	0	95	3,49
50	0	5	0	0	5	0	5	5	0	80	13,3
51	5	0	0	0	0	0	3,3	0	5	86,7	14,6
52	0	0	0	0	0	5	0	0	5	90	13,5
53	0	5	5	0	0	5	0	0	0	85	2,34
54	5	1,7	5	1,7	0	0	0	3,3	3,3	80	5,82
55	5	2,5	2,5	0	5	0	5	0	0	80	12,1
56	2,5	0	5	0	0	0	5	2,5	5	80	16,0
57	0	5	5	5	0	0	5	0	0	80	8,11
58	5	0	0	5	0	0	0	0	0	90	13,8
59	5	0	0	5	5	0	0	0	5	0,8	9,07
60	5	0	0	5	0	2,5	5	0	2,5	80	11,3
61	2,5	0	5	0	0	0	5	2,5	5	80	12,4
62	5	0	0	0	0	5	0	0	0	90	4,86
63	0	0	0	0	5	5	0	0	0	90	13,4
64	0	0	5	0	5	5	5	0	0	80	3,33
65	5	5	0	2,5	5	0	2,5	0	0	80	9,39

¹ Diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-1); mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2); monopalmitato de sacarosa, CAS: 26446-38-8 (EMF-3); 2,3-dihidroxipropil-docosanoato, CAS: 30233-64-8 (EMF-4); gliceril-palmito-estearato, CAS: 8067-32-1 (EMF-5); poligliceril-oleato, CAS: 76009-37-5 (EMF-6); propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7); gliceril-monoestearato, CAS: 31566-31-1 (EMF-8); hexagliceril-diestearato, CAS:34424-97-0 (EMF-9).

Tabla 13.- Valores y significación de los coeficientes de los factores e interacciones entre factores del modelo experimental generado a partir de los resultados experimentales expuestos en la Tabla 12.

número	término modelo ¹	valor coeficiente	p	número	término modelo	valor coeficiente	p
1	1	22,6	0,88	31	3 × 7	-178,1	0,43
2	2	-64,7	0,52	32	3 × 8	-287,5	0,25
3	3	169,3	0,18	33	3 × 9	-47,7	0,84
4	4	139,2	0,17	34	3 × 10	-206,4	0,24
5	5	-93,2	0,40	35	4 × 5	49,4	0,81
6	6	27,8	0,82	36	4 × 6	-225,9	0,34
7	7	-21,7	0,85	37	4 × 7	-131,6	0,55
8	8	37,4	0,72	38	4 × 8	-235,3	0,25
9	9	-95,8	0,50	39	4 × 9	-80,9	0,67
10	10	5,4	0,20	40	4 × 10	-124,1	0,34
11	1 × 2	92,0	0,74	41	5 × 6	96,8	0,66
12	1 × 3	-200,5	0,44	42	5 × 7	164,5	0,41
13	1 × 4	-218,3	0,39	43	5 × 8	200,7	0,35
14	1 × 5	153,1	0,51	44	5 × 9	234,1	0,25
15	1 × 6	-103,2	0,73	45	5 × 10	178,4	0,22
16	1 × 7	70,8	0,79	46	6 × 7	-31,6	0,89
17	1 × 8	-126,3	0,58	47	6 × 8	-29,2	0,88
18	1 × 9	120,7	0,60	48	6 × 9	198,6	0,36
19	1 × 10	-6,5	0,97	49	6 × 10	-18,3	0,91
20	2 × 3	-147,7	0,43	50	7 × 8	-41,3	0,85
21	2 × 4	-92,5	0,62	51	7 × 9	267,8	0,22
22	2 × 5	182,6	0,33	52	7 × 10	25,8	0,86
23	2 × 6	56,05	0,80	53	8 × 9	127,4	0,52
24	2 × 7	161,7	0,46	54	8 × 10	-40,7	0,77
25	2 × 8	121,9	0,52	55	9 × 10	144,6	0,45
26	2 × 9	193,2	0,39				
27	2 × 10	84,8	0,54				
28	3 × 4	-374,7	0,08				
29	3 × 5	-84,9	0,73				
30	3 × 6	-253,6	0,34				

¹Cada número se corresponde con un emulgente: 1: Diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-1); 2: mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2); 3: monopalmitato de sacarosa, CAS: 26446-38-8 (EMF-3); 4: 2,3-dihidroxipropil-docosanoato, CAS: 30233-64-8 (EMF-4); 5: gliceril-palmito-estearato, CAS: 8067-32-1 (EMF-5); 6: poligliceril-oleato, CAS: 76009-37-5 (EMF-6); 7: propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7); 8: gliceril-monoestearato, CAS: 31566-31-1 (EMF-8); 9: hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0 (EMF-9). 10: Agua.

En las formulaciones elaboradas con los distintos emulgentes que conforman el grupo de lipoazúcares, se observaron diferentes resultados respecto a los valores de EM. Si se consideran sólo los efectos producidos individualmente por cada emulgente (Tabla 13) parece que la incorporación micelar depende de las características lipofílicas de cada lipoazúcar. Así, el valor de respuesta más elevado se observó en la formulación que contiene EMF-3 como emulgente (valor del término, 169,3). Una disminución en el valor de este término se detectó tras emplear emulgentes con mayor longitud de la cadena lipofílica y mayor grado de esterificación que EMF-3 (coeficientes 22,6 y -64,7 para EMF-1 y EMF-2, respectivamente). Fanun (2008) ya había observado cómo la solubilidad de compuestos liposolubles en emulsiones, tiende a disminuir cuando aumenta el carácter lipofílico de los emulgentes. En este estudio esa baja solubilidad reduciría la eficiencia del intercambio de carotenoides desde la matriz a las micelas, provocando un efecto negativo sobre la EM. En este sentido, el uso de acilglicéridos en la formulación de emulsiones podría permitir una mejor solubilización e intercambio de los carotenoides, debido a la presencia de glicerol en la composición, en lugar de sacarosa, proporcionándole una mayor flexibilidad a la interfase (Garti y colaboradores, 2002).

También se observaron diferencias en la EM, tras emplear de forma individual cada uno de los emulgentes constituyentes del grupo de los acilglicéridos. El valor del término más alto correspondió a EMF-4 (139,2), un valor menor pero positivo para EMF-8 (37,4), mientras que se obtuvieron valores negativos del término para EMF-5 y EMF-7 (-93,2 y -21,7, respectivamente). En estos casos, se combinan dos factores (grado de esterificación y longitud de la cadena lipofílica) que determinan el valor de EM. Huo y colaboradores (2007), observaron que la micelarización de carotenos es dependiente de la longitud de la cadena acílica de los triglicéridos pero no del grado y posición de las insaturaciones, ya que un aumento en su longitud originaba una mayor eficiencia de micelarización. Esta conclusión se correlaciona con la tendencia observada en este estudio. En nuestros ensayos, el emulgente con una longitud de la cadena acílica mayor, es el que presentó el valor más alto del término (EMF-4, con 22 átomos de carbono) y observándose una disminución del coeficiente cuando disminuye la longitud de la cadena acílica (EMF-8>EMF-5>EMF-7).

Con respecto a los poliacilglicéridos, los valores de respuesta obtenidos tras el empleo individual de cada uno de los componentes de este grupo son muy diversos (Tabla 13) y no se pueden extraer correlaciones entre sus características estructurales y los resultados. En publicaciones anteriores, como la desarrollada por Guo y colaboradores en 2000, se observó que la adición de poligliceril oleatos (como EMF-6) con 3, 6, y 10 grupos glicerol en su estructura, a la formulación de una emulsión, formaba una estructura líquida cristalina laminar con agua, y la penetración de ella en esta estructura se reducía cuando aumentaba el número de grupos glicéridos en el emulgente. Este efecto disminuiría la transferencia desde la emulsión a las micelas y por tanto la EM.

Todas las hipótesis anteriores que describen los efectos individuales observados, no deben ser consideradas como definitivas ni incluso relevantes respecto al objetivo de esta fase del experimento, ya que la combinación de diferentes emulgentes, que individualmente puedan ser positivos o negativos para la respuesta, puede originar un efecto sinérgico o antagónico en la respuesta observada de forma individual, en otras palabras, deben tenerse en cuenta los efectos secundarios. A modo de ejemplo, si tenemos en cuenta sólo los efectos individuales (aquellos producidos por cada emulgente, y que se corresponden con los términos del 1 al 10 de la Tabla 13), parece que EMF-3 y EMF-4 son los agentes emulgentes más efectivos (valores de los coeficientes 169,3 y 139,2, respectivamente); sin embargo esta primera aproximación no es la adecuada ya que sus interacciones secundarias son significativamente negativas y muestran un efecto antagónico sobre la respuesta (valor del coeficiente -374,7, Tabla 13), que anula los efectos individuales observados por EMF-3 y EMF-4, por lo que se puede adelantar que ambos emulgentes no pasarán a la fase de optimización.

La primera conclusión que se puede obtener es que la máxima respuesta en el modelo no se obtendrá tras el empleo individual de los emulgentes comentados anteriormente, ya que se deben considerar además las interacciones secundarias (sinérgicas o antagónicas) surgidas entre ellos y que modifican sustancialmente el valor de la respuesta observada de forma individual, positiva o negativamente. Por lo tanto, la combinación de diferentes emulgentes será la que proporcione el óptimo de digestibilidad buscado.

A continuación se expone el proceso de selección de los componentes o factores críticos para la fase de optimización. Considerando las interacciones secundarias, se pueden identificar en la Tabla 13 los valores positivos más altos de los coeficientes; 267,8 (término número 51, sinergia entre EMF-7 y EMF-9), 234,1 (término número 44, sinergia entre EMF-5 y EMF-9), 200,7 (término número 43, sinergia entre EMF-5 y EMF-8), 198,6 (término número 48, sinergia entre EMF-6 y EMF-9), 193,2 (término número 26, sinergia entre EMF-2 y EMF-9), 182,6 (término número 22, sinergia entre EMF-2 y EMF-5), 178,4 (término número 45, sinergia entre EMF-5 y EMF-10), 164,5 (término número 42, sinergia entre EMF-5 y EMF-7), 161,7 (término número 24, sinergia entre EMF-2 y EMF-7), y 153,1 (término número 14, sinergia entre EMF-1 y EMF-5). Tras los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta el criterio de exclusión empleado, se podrían utilizar como ingredientes en la fase de optimización, los siguientes emulgentes: EMF-1, EMF-2, EMF-5, EMF-6, EMF-7, EMF-8 y EMF-9. De acuerdo con el valor y el signo de las interacciones secundarias en las que están implicados estos emulgentes, se decidió eliminar a aquellos que estaban implicados en fuertes antagonismos. Como consecuencia de ello, en la fase de optimización se construirá un diseño experimental para los siguientes emulgentes: EMF-2, EMF-5, EMF-7 y EMF-9. Con respecto al agua, debido al pequeño valor del coeficiente (5,4, término número 10, Tabla 13), se considera un valor constante de 80% (p/p) en la fase de optimización.

Optimización de la mezcla de factores críticos

Una vez escogidos en la fase de barrido los emulgentes que *a priori* producen una mayor eficiencia en la micelarización de carotenoides desde la emulsión, se aplicará el diseño experimental (SC), de acuerdo con lo expuesto en la Tabla 14 tal y como se había mencionado en el apartado de Materiales y Métodos (ver página 70). Los resultados obtenidos en la fase de optimización se muestran en la Tabla 15, mientras que los coeficientes de regresión estimados se exponen en la Tabla 16. Según el análisis de regresión de los datos experimentales, éstos se ajustan a un modelo cuadrático, en este caso significativo (grados de libertad 9, $F = 5,14$, $p = 0,043$). Los factores significativos son aquellos que resultan de interacciones entre emulgentes (Tabla 16). El valor F del modelo (5,14) implica que el modelo es significativo con una probabilidad del 4,3% de que éste pudiera deberse al *ruido* experimental. Las cantidades

de R^2 y R^2_{adj} se corresponden con 0,902 y 0,727, respectivamente. La precisión adecuada alcanza un valor de 8,070.

Tabla 14.- Diseño experimental aplicado en la fase de optimización a los emulgentes seleccionados en la primera fase.

emulgente ¹	Niveles (%)				
EMF-2	0	25	33,3	50	100
EMF-5	0	25	33,3	50	100
EMF-7	0	25	33,3	50	100
EMF-9	0	25	33,3	50	100

¹ mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2)
 gliceril-palmito-estearato, CAS: 8067-32-1 (EMF-5)
 propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7)
 hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0 (EMF-9).

Tabla 15.- Datos experimentales de la EM obtenidos a partir de la aplicación del diseño experimental (SC) en la fase de optimización.

prueba	emulgente ¹				EM (%)
	EMF-2	EMF-5	EMF-7	EMF-9	
1	50	0	50	0	20,6
2	33,3	33,3	33,3	0	13,8
3	0	100	0	0	11,3
4	25	25	25	25	17,3
5	50	0	0	50	5,71
6	33,3	0	33,3	33,3	19,9
7	0	0	50	50	13,1
8	0	0	100	0	7,89
9	0	33,3	33,3	33,3	11,4
10	100	0	0	0	5,98
11	0	0	0	100	3,39
12	33,3	33,3	0	33,3	5,10
13	0	50	0	50	5,96
14	50	50	0	0	4,30
15	0	50	50	0	4,28

¹ mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2)

gliceril-palmito-estearato, CAS: 8067-32-1 (EMF-5)

propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7)

hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0 (EMF-9).

Tabla 16.- Valores y significación de los coeficientes de los factores e interacciones entre factores del modelo experimental generado a partir de los resultados experimentales expuestos en la Tabla 15.

Número	término modelo ¹	valor coeficiente	p
1	2	5,3	0,14
2	5	10,6	0,02
3	7	6,9	0,07
4	9	2,7	0,41
5	2 × 5	-10,6	0,45
6	2 × 7	66,9	0,00
7	2 × 9	11,7	0,40
8	5 × 7	-9,9	0,48
9	5 × 9	1,0	0,94
10	7 × 9	42,2	0,02

¹ Cada número se corresponde con un emulgente:

2: mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4 (EMF-2)

5: gliceril-palmito-estearato, CAS: 8067-32-1 (EMF-5)

7: propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7 (EMF-7)

9: hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0 (EMF-9).

Todavía se puede ajustar la formulación óptima de la emulsión que origina una respuesta máxima si se observan las interacciones entre emulgentes de la Tabla 16. Así, el emulgente EMF-5 está implicado en dos medios antagónicos con EMF-2 y EMF-7, así que este ingrediente puede ser eliminado de la mezcla final para no disminuir el valor de la respuesta máxima optimizado. Con ello, parece que la mezcla de componentes que proporcionará la respuesta máxima incluye a EMF-2, EMF-7 y EMF-9 (EMF-2: mezcla de mono y diestearato de sacarosa, CAS: 25168-73-4; EMF-7: propilenglicol-laurato, CAS: 27194-74-7; EMF-9: hexagliceril-diestearato, CAS: 34424-97-0).

Es el momento de calcular la composición de la formulación que, con los tres componentes seleccionados maximiza la respuesta según el modelo. Se trata de calcular el punto estacionario del sistema (matemáticamente, un punto de la función cuadrática cuya derivada es cero, y que, desde un punto de vista práctico muestra la mejor combinación de los ingredientes, para obtener el máximo nivel de micelarización). Este punto se obtuvo a través de una mezcla de los siguientes compuestos: EMF-2 (36,73%), EMF-7 (45,26%) y EMF-9 (18,01%), alcanzando la máxima respuesta, EM = 23,07% (Figura 23). La presencia de EMF-2 en la formulación óptima es un ejemplo de porqué los efectos individuales de la fase de barrido no se deben considerar definitivos. Si se hubieran considerado los efectos individuales como criterio para descartar componentes (Tabla 13), se habría eliminado al componente EMF-2 de la lista de ingredientes para realizar la fase de optimización pero, como se mencionó anteriormente, en esta etapa del experimento aquellos efectos individuales no debían utilizarse como criterio discriminativo.

Es posible encontrar referencias bibliográficas sobre fármacos elaborados con alguno de los ingredientes que maximizan la EM. Okamoto y colaboradores (2005) emplearon EMF-7 para incrementar la transferencia del compuesto activo al tejido diana. El empleo de EMF-7 produciría un efecto denominado *salting-in*, incrementando la fluidez de la interfase y disminuyendo la polaridad del entorno acuoso. Este efecto mejoraría la transferencia de los compuestos lipofílicos a las micelas (Garti y colaboradores, 2001; Yaghmur y colaboradores, 2002). La adición de EMF-9 también facilitaría la solubilización de los carotenoides y su

posterior transferencia a las micelas. Su uso en medicamentos se ha descrito recientemente (El-Kamel y colaboradores, 2007).

La aplicación de un diseño experimental permitió la creación de una formulación con el objetivo de maximizar la digestibilidad de compuestos bioactivos (como los carotenoides). Este procedimiento ofrece la posibilidad de obtener la composición de una formulación que proporcione la máxima digestibilidad de carotenoides. El diseño de alimentos funcionales necesita la estimación de la digestibilidad de estos compuestos bioactivos como criterio de control, por lo que la investigación analítica llevada a cabo en este trabajo puede ser de gran interés en la industria alimentaria para examinar y controlar aquellos factores y componentes de la matriz que modifiquen la digestibilidad de componentes bioactivos y, consecuentemente, seleccionar aquella composición óptima que facilite la mayor disponibilidad.

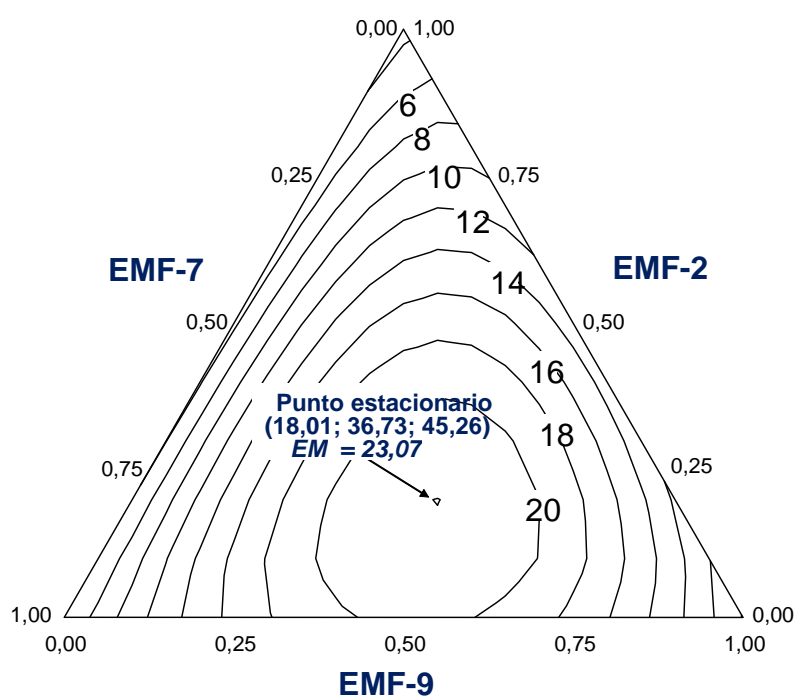


Figura 23.- Contorno para la respuesta EM en la mezcla compuesta por los emulgentes EMF-2, EMF-7 y EMF-9 y localización del punto estacionario que maximiza la respuesta.

Eficiencia de la asimilación de carotenoides suministrados como complejos de inclusión con β -ciclodextrina en un modelo *in vitro*. Efecto de inhibidores lipoproteicos

El modelo de difusión pasiva que explica la absorción de compuestos lipídicos a través de la membrana de los enterocitos, presente en la mayoría de revisiones y volúmenes científicos dedicados a la absorción de nutrientes, está siendo sometido a una extensa revisión en los últimos años. Los resultados obtenidos con diferentes modelos experimentales, *in vitro* e *in vivo*, están proporcionando evidencias acerca de la existencia de transportadores que facilitan la absorción de compuestos lipofílicos como colesterol (libre o esterificado), triacilglicéridos y fosfolípidos (Compassi y colaboradores, 1995; Werder y colaboradores, 2001; von Bergmann y colaboradores, 2005). Alguno de los transportadores identificados son los receptores residuales tipo B, determinante de grupo 36 (CD36) y la proteína Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).

El modelo de difusión facilitada da explicación a la significativa variabilidad entre individuos de la eficiencia en absorción de compuestos lipídicos (Borel y colaboradores, 1998; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2005) y conjuga diferentes situaciones patofisiológicas del epitelio intestinal con deficientes niveles de absorción de lípidos, situaciones que no eran totalmente compatibles con el modelo de absorción de difusión simple. La implicación de los transportadores mencionados anteriormente, en el proceso de asimilación de lípidos se ha demostrado utilizando inhibidores competitivos como apolipoproteínas y lipoproteínas del suero, péptidos α -helicoidales anfipáticos, y fármacos de síntesis como la ezetimiba.

Algunos de los indicios que promovieron la búsqueda del actual mecanismo de absorción para colesterol y otros compuestos lipofílicos también se intuían para otros compuestos como los carotenoides. Esta familia de isoprenoides, cuya presencia en el organismo de los mamíferos se debe exclusivamente a la dieta, desarrolla una serie de funciones y acciones biológicas de significativo interés en la salud humana, por lo que los eventos asociados a su asimilación se estudian con atención. Los ensayos clínicos *in vivo* mostraban una gran variabilidad de la eficiencia de absorción entre individuos, apareciendo el concepto de no-respondedores; también se demostraba la competencia por la absorción entre diferentes

compuestos, la tendencia a acumular en tejidos biológicos un grupo reducido de carotenoides a pesar de que la ingesta de frutas y vegetales aporta un número más amplio, e incluso la existencia de esteroespecificidad en la absorción (Khachik y colaboradores, 1991; 1992; van den Berg, 1999; During y colaboradores, 2002). Todos estos indicios hacían pensar en la posibilidad de un mecanismo de transporte de difusión facilitada, similar o incluso coincidente con el de colesterol.

La prueba definitiva llegó con el estudio de Kiefer y colaboradores (2002) en el que se demostró que un receptor residual, denominado *ninaD*, es esencial para la absorción de carotenoides y que la secuencia que codifica ese receptor es significativamente homóloga al receptor residual tipo B presente en mamíferos. Posteriormente, se han publicado estudios que sustentan la anterior evidencia y la analogía con el mecanismo de absorción propuesto para colesterol y otros lípidos. El receptor residual tipo B, es esencial para la absorción de β -caroteno como lo demuestra el estudio de van Bennekum y colaboradores (2005) en el que, utilizando ratones SR-BI knock-out, se observó un descenso significativo de la absorción intestinal de la provitamina A, en comparación con el grupo control. Reboul y colaboradores (2005) extienden la implicación de SR-BI al transporte de luteína. Pero, al igual que para colesterol, el receptor residual SR-BI no es el único implicado en la asimilación celular de carotenoides como lo demuestra el estudio de During y colaboradores (2005). Utilizando un modelo experimental *in vitro* y tratando las células con un inhibidor del transporte para colesterol, ezetimiba, se observa cómo la eficiencia de la absorción disminuye significativamente aunque no por igual para todos los carotenoides incluidos en el estudio y que el tratamiento con ezetimiba disminuye la expresión de los genes que codifican transportadores de lípidos como SR-BI, NPC1L1 y ABCA1. En la absorción de carotenoides existe más de un transportador implicado aunque es posible que la afinidad de cada uno de ellos por los diferentes carotenoides de la dieta no sea la misma. Recientemente, el trabajo de Moussa y colaboradores (2008) especifica la preferencia del receptor SR-BI en la asimilación de licopeno frente al transportador NPC1L1.

La reconstrucción del proceso de absorción de lípidos, en lo referente al mecanismo de asimilación por las células del epitelio intestinal ha abierto nuevas vías para inhibir

intencionadamente la asimilación de colesterol. A las alternativas ya existentes del uso de esteroides vegetales, que compiten con el colesterol por la incorporación a micelas, y las resinas poliméricas que secuestran las sales biliares (cholestyramine, colestipol) se unen los fármacos que bloquean los transportadores que facilitan la asimilación (Norata y Catapano, 2004). La interferencia a cualquier nivel del proceso de asimilación de colesterol afectará a la asimilación de otros lípidos de la dieta como las vitaminas liposolubles y los carotenoides. De hecho, se recomienda un incremento del consumo de frutas y vegetales cuando se ingieren fitoesteroides para evitar un descenso en los niveles plasmáticos de vitaminas liposolubles y carotenoides (Noakes y colaboradores, 2002; Colgan y colaboradores, 2004). Esta recomendación resulta efectiva puesto que la interferencia en el proceso de micelarización y asimilación tiene lugar sólo cuando se ingieren los fitoesteroides, y su efecto no se perpetúa (Heinemann y colaboradores, 1991). Sin embargo, el tratamiento con fármacos puede tener un efecto más prolongado debido a su metabolismo y *modus operandi*. Por ejemplo la ezetimiba se metaboliza en el hígado mediante enzimas de fase II generando el compuesto glucuronidizado, que retorna al intestino donde desarrolla una acción más potente que la ezetimiba inicial (van Heek y colaboradores, 2000). Si la opción escogida para disminuir la absorción de colesterol es el tratamiento con fármacos que bloqueen su transporte en el epitelio intestinal e incluso disminuyan la expresión génica de los transportadores implicados en la difusión facilitada, no está claro si un incremento en la dieta del consumo de frutas y vegetales podría compensar el descenso en los niveles plasmáticos de vitaminas liposolubles y carotenoides.

Las ciclodextrinas son oligomaltosacáridos cíclicos obtenidos a partir del almidón mediante una reacción de ciclación enzimática por la ciclodextrin glucosiltransferasa. La extraordinaria habilidad para formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas que son albergadas en el interior de la cavidad tórica de la ciclodextrina, ha generado una amplia diversidad de usos en áreas como la agricultura, la química analítica, la alimentación, el sector farmacéutico y productos de higiene, cosmética y limpieza (Singh y colaboradores, 2002). En alimentación sus usos más extendidos incluyen la protección y liberación controlada de compuestos flavorizantes, la eliminación de sabores y la estabilización de emulsiones como salsas, cremas, mantequillas y mayonesas. Dentro de la serie de ciclodextrinas (α -, β -, γ , y δ -

ciclodextrina) es la β -ciclodextrina la que más comúnmente se aplica en formulaciones farmacéuticas y la que más ha sido estudiada en humanos (Martin Del Valle, 2004). La propiedad de las ciclodextrinas que las convierte en compuestos relevantes en el ámbito farmacéutico, consiste en su habilidad de aumentar la asimilación de fármacos hidrofóbicos, actuando como transportadores hasta la proximidad de la membrana biológica (piel, mucosa, córnea) incrementando la disponibilidad del fármaco complejoado y su asimilación (Rajewski y Stella, 1996). El modelo de absorción *in vitro* basado en las VMBC se ha utilizado con éxito para evaluar la asimilación de diferentes compuestos liposolubles, incluyendo a los carotenoides (Moore y colaboradores, 1996; Lancrajan y colaboradores, 2001), así como para determinar la existencia del mecanismo de difusión facilitada mediante el uso de distintos inhibidores que bloquean la actividad de las proteínas que intervienen en el mencionado mecanismo de absorción (van Bennekum y colaboradores, 2005).

En la Figura 24 se representa la cantidad carotenoide, expresada en pmol/mg proteína, incorporada a la membrana plasmática de VMBC después de 20 minutos de incubación a 37 °C para β -caroteno, luteína y licopeno, desde la suspensión Tween o desde la solución acuosa de complejos de inclusión, en función de la concentración inicial carotenoide (0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M). En algunos casos se puede observar una amplia desviación estándar del valor medio de absorción, a consecuencia de la dispersión de datos. Este hecho puede ser indicativo de variaciones en la composición y densidad de transportadores disponibles en las preparaciones de VMBC como ya se ha indicado anteriormente (Werder y colaboradores, 2001) al igual que ocurre *in vivo* (Wilson y Rudel, 1994; Carter y colaboradores, 1997).

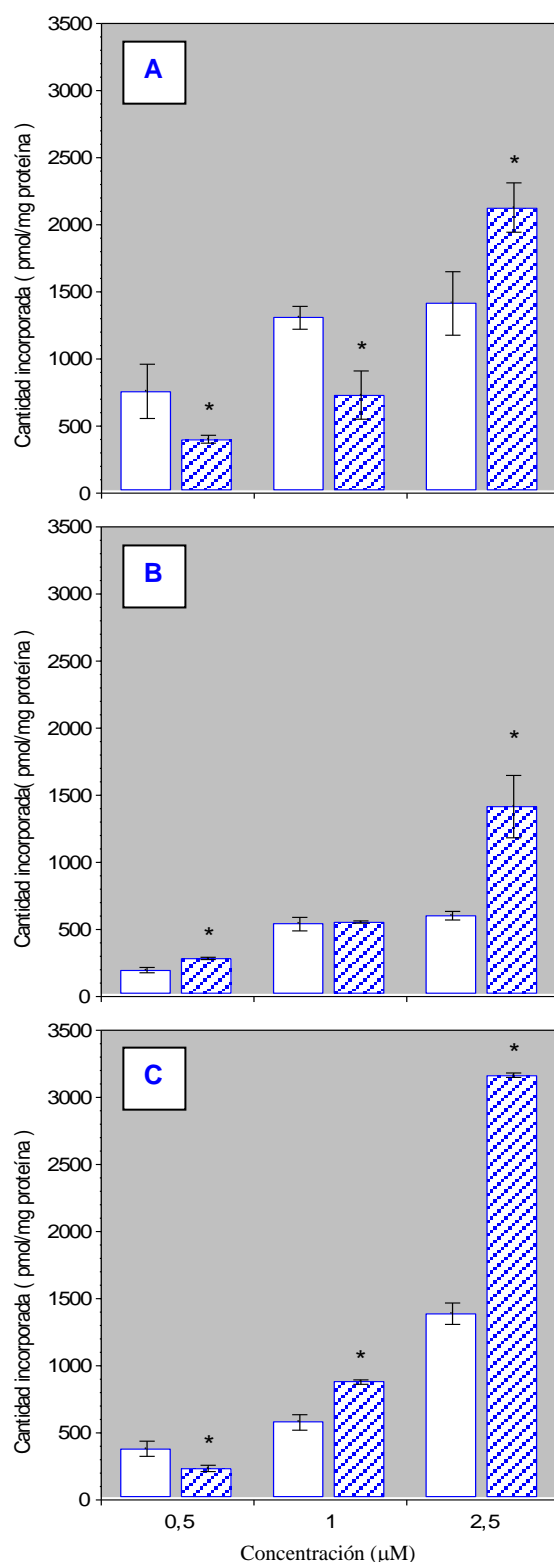


Figura 24.- Cantidad carotenoide, expresada en pmol/mg proteína, incorporada a la membrana plasmática de VMBC después de veinte minutos de incubación a 37 °C para β -caroteno (**A**), luteína (**B**) y licopeno (**C**), desde la suspensión Tween (barras blancas) o desde la solución acuosa de complejo de inclusión β -ciclodextrina/carotenoide (barras azules), en función de la concentración inicial carotenoide (0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M). Los valores de asimilación obtenidos se representan como valores medios \pm SD (n=3); diferencias significativas en los niveles de asimilación alcanzados para los dos tipos de soluciones donadoras, para cada pigmento, y para cada concentración ($p < 0,01$, test Duncan) se indican mediante un asterisco.

La comparación de la eficiencia del transporte entre carotenoides indica una mayor asimilación para los carotenos, respecto a la xantofila luteína. La cantidad asimilada de luteína representa el 26% y el 52% en comparación con la de β -caroteno y licopeno, respectivamente, a la concentración de 0,5 μ M. La Tabla 17 muestra los coeficientes calculados en base al modelo lineal que correlaciona la respuesta (asimilación) con los factores primarios *concentración* y *tipo de carotenoide*. Puede observarse como los coeficientes para β -caroteno y licopeno son muy similares el uno del otro y diferentes del coeficiente obtenido para luteína en cada uno de los dos factores analizados. Este hecho puede interpretarse de dos maneras. La primera hipótesis es que si los tres carotenoides tienen el mismo mecanismo de asimilación la diferencia en la eficiencia de asimilación observada es resultado de sus diferentes características químicas. En un estudio anterior se comprobó cómo la xantofila luteína presenta una menor accesibilidad que los carotenos, cuando la incorporación se realiza desde soluciones individuales de carotenoides (Fernández-García y colaboradores, 2007), coincidiendo con la tendencia observada en el presente estudio. La presencia de grupos hidroxilo en los anillos de los extremos, confieren cierta polaridad a la molécula de luteína lo que puede dificultar su incorporación a la membrana plasmática. Esta hipótesis viene a apoyar el efecto similar detectado para β -caroteno y licopeno respecto del factor *tipo de solución donante*. Sin embargo, se observó un diferente efecto de inhibición (adición de HDLs como inhibidores competitivos) para los carotenos (720 para β -caroteno y 398 para licopeno) pudiéndose elaborar una segunda hipótesis. Si tiene lugar un mecanismo de difusión facilitada, los transportadores pueden tener una mayor afinidad por compuestos de naturaleza más hidrofóbica. Aunque se haya demostrado que los receptores residuales ejercen su actividad sin demasiada discriminación estructural, facilitando la asimilación de colesterol libre y esterificado, triacilglicéridos y fosfolípidos, Werder y colaboradores (2001) sugieren que el receptor SR-BI facilita preferentemente la asimilación de aquellos lípidos más hidrofóbicos. Esta segunda interpretación adquirirá mayor importancia cuando se analicen los resultados de eficiencia de asimilación en presencia de un inhibidor.

Tabla 17.- Efectos primarios de los factores *concentración, tipo de solución donadora e inhibición* en la asimilación intestinal *in vitro* de β -caroteno, luteína y licopeno en preparaciones de vesículas de membrana de borde en cepillo.

factor¹	β-caroteno	luteína	licopeno
concentración	2,085	784	2,087
tipo de solución donadora	1,370	579	1,502
inhibición	720	-256	398

¹ **Niveles de concentración:** 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M; **tipo de solución donadora:** suspensiones carotenoides en Tween o complejos de inclusión carotenoide con β -ciclodextrina; **inhibición:** presencia o ausencia de soluciones de HDLs.

Cuando se incuban las preparaciones de VMBC con la suspensión Tween carotenoides en distintas concentraciones (Figura 24) sólo se aprecia un incremento de la cantidad absorbida a medida que aumenta la concentración inicial en el caso de licopeno, mientras que las cantidades absorbidas de β -caroteno y luteína a las concentraciones de 1 μM y 2,5 μM , no son diferentes entre sí (valores de $p = 0,381$ y $p = 0,607$, para β -caroteno y luteína respectivamente), aunque son significativamente superiores a los alcanzados con la concentración de 0,5 μM . A los mencionados niveles de concentración y para esos carotenoides es posible que se esté alcanzando la saturación del transporte, en las condiciones experimentales establecidas. En el estudio de Moore y colaboradores (1996) se observó el transporte lineal (no saturado) de β -caroteno hasta una concentración de 6 μM . Aunque este trabajo se realizó con el mismo modelo experimental, VMBC *in vitro*, éstas se aislaron de mucosa intestinal de rata en vez de cerdo (utilizado en este estudio) lo que puede ser la causa de estas diferencias. Los resultados aquí obtenidos se asemejan más a los estudios de During y colaboradores (1998) y Reboul y colaboradores (2005) en los que se estableció una concentración de 2 μM y 5,56 μM en la solución donante como inicio de la saturación del transporte de β -caroteno y luteína, respectivamente.

Este efecto de saturación no se aprecia en los experimentos de absorción realizados con las soluciones acuosas de complejos de inclusión. Tomando como ejemplo representativo a luteína, la presencia o ausencia de saturación en la absorción se puede apreciar detalladamente en la Figura 25. Esta figura representa la velocidad de absorción (expresada en $\text{pmol} \times (\text{mg proteína} \times \text{min})^{-1}$) vs. la concentración inicial de luteína para los experimentos realizados con suspensión Tween y con solución acuosa de complejos de inclusión. En el caso de las incubaciones de VMBC con suspensión Tween de luteína, la velocidad de absorción se aproxima a una curva hiperbólica, mientras que la velocidad de absorción tiene un ajuste lineal cuando el experimento de absorción se realiza con solución acuosa de complejos de inclusión.

La saturación de la velocidad de absorción es una de las primeras señales para argumentar la existencia de un mecanismo de difusión facilitada como se ha indicado anteriormente (During y colaboradores, 1998; 2002; Reboul y colaboradores, 2005). En ese

caso, y a partir de la concentración de saturación, los sucesivos incrementos de la concentración inicial no implican incrementos significativos en la velocidad de absorción, como consecuencia de la saturación de los transportadores de membrana que facilitan la asimilación de carotenoides. Cuando el proceso de asimilación se produce desde las soluciones acuosas de complejo de inclusión la linealidad entre la velocidad de absorción y la concentración puede indicar que la asimilación tiene lugar mediante el mecanismo de difusión simple. No obstante, habría que considerar la posibilidad de que exista efecto de saturación cuando la asimilación se realiza desde soluciones de complejo de inclusión pero a concentraciones superiores a la máxima utilizada en el presente estudio, es decir, no se puede descartar que el proceso de asimilación también ocurra mediante difusión facilitada pero el experimento sólo permite observar la zona de ajuste lineal. Esta más que posible simultaneidad de los procesos de asimilación (difusión simple y facilitada) es algo inherente al modelo *in vitro* utilizado para estimar la asimilación, que presenta absorción no específica. Este hecho quedará mostrado en este estudio más adelante.

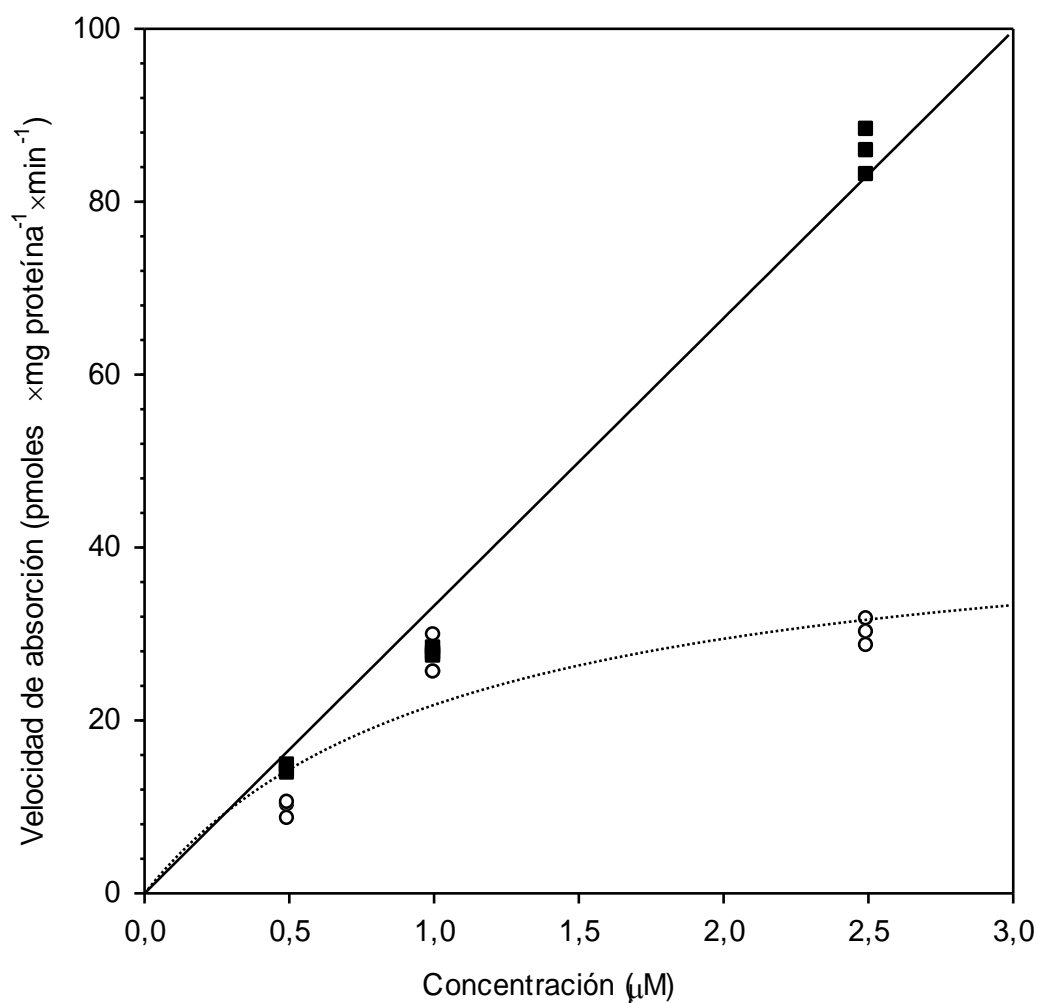


Figura 25.- Velocidad de absorción (expresada en $\text{pmol} \times (\text{mg proteína} \times \text{min})^{-1}$) frente a la concentración inicial de luteína (0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM) para los experimentos realizados con suspensión Tween y con solución acuosa de complejo de inclusión. La velocidad de absorción se aproxima a una curva hiperbólica (línea discontinua, $R^2_{\text{adj}} = 0,8780$), cuando la solución donante procede de suspensión Tween carotenoide, o bien la velocidad de absorción tiene un ajuste lineal (línea continua, $R^2_{\text{adj}} = 0,9834$) cuando la solución donante procede de complejos de inclusión.

Independientemente del mecanismo de asimilación hay un factor relevante a considerar en el caso de la asimilación de carotenoides desde las soluciones acuosas de complejos de inclusión. En el rango de concentraciones experimentales, el proceso se puede explicar mediante la ley de Fick. La inclusión carotenoide en la ciclodextrina, aumenta considerablemente la solubilidad en agua y por tanto el coeficiente de partición, P , lo que finalmente implica un incremento de la velocidad de difusión. Pero el proceso de asimilación carotenoide desde los complejos de inclusión no tiene lugar en una sola etapa, ya que el complejo de inclusión no se absorbe íntegramente sino que antes, la molécula carotenoide se libera del complejo para, posteriormente, ser asimilada.

Para determinar si se ha producido o no absorción del complejo de inclusión carotenoide por vesículas de membrana de borde en cepillo, se realizaron análisis por espectrometría de masas. En la Figura 26 se representan los espectros de masas de la solución acuosa de complejos de inclusión de luteína (figura 26A) y del lisado de una preparación de VMBC que fue, previamente, incubada con solución acuosa de complejos de inclusión de luteína, y separada de dicha solución por centrifugación tras finalizar la incubación (figura 26B). En el primer espectro se aprecia el ión molecular correspondiente al complejo de inclusión β -ciclodextrina:luteína mientras que en el segundo sólo se observa el ión molecular de luteína.

El hecho de que ciclodextrina (libre o formando complejos de inclusión) no se absorba ya se ha descrito previamente (Uekama y Otagiri, 1987; Hirayama y Uekama, 1999). El proceso de liberación de la molécula complejada en la ciclodextrina constituye un equilibrio entre el complejo de inclusión y las moléculas que lo constituyen, por separado, en este caso ciclodextrina y pigmento. La velocidad de disociación depende, entre otros factores, de la energía de enlace entre la ciclodextrina y la molécula “guest”, y la concentración inicial de complejo en solución (Loftsson y Brewster, 1996; Stella y colaboradores, 1999). A igual concentración una mayor energía de enlace dificulta la disociación y ralentiza el proceso. La importancia de este factor no se puede apreciar en los experimentos realizados en este estudio puesto que la disociación se acopla con el proceso de asimilación en el que también intervienen otros factores como la capacidad de difusión a través de la membrana, si se

considera la asimilación por difusión simple, o la diferente afinidad de los transportadores por cada carotenoide, si se considera la asimilación por difusión facilitada.

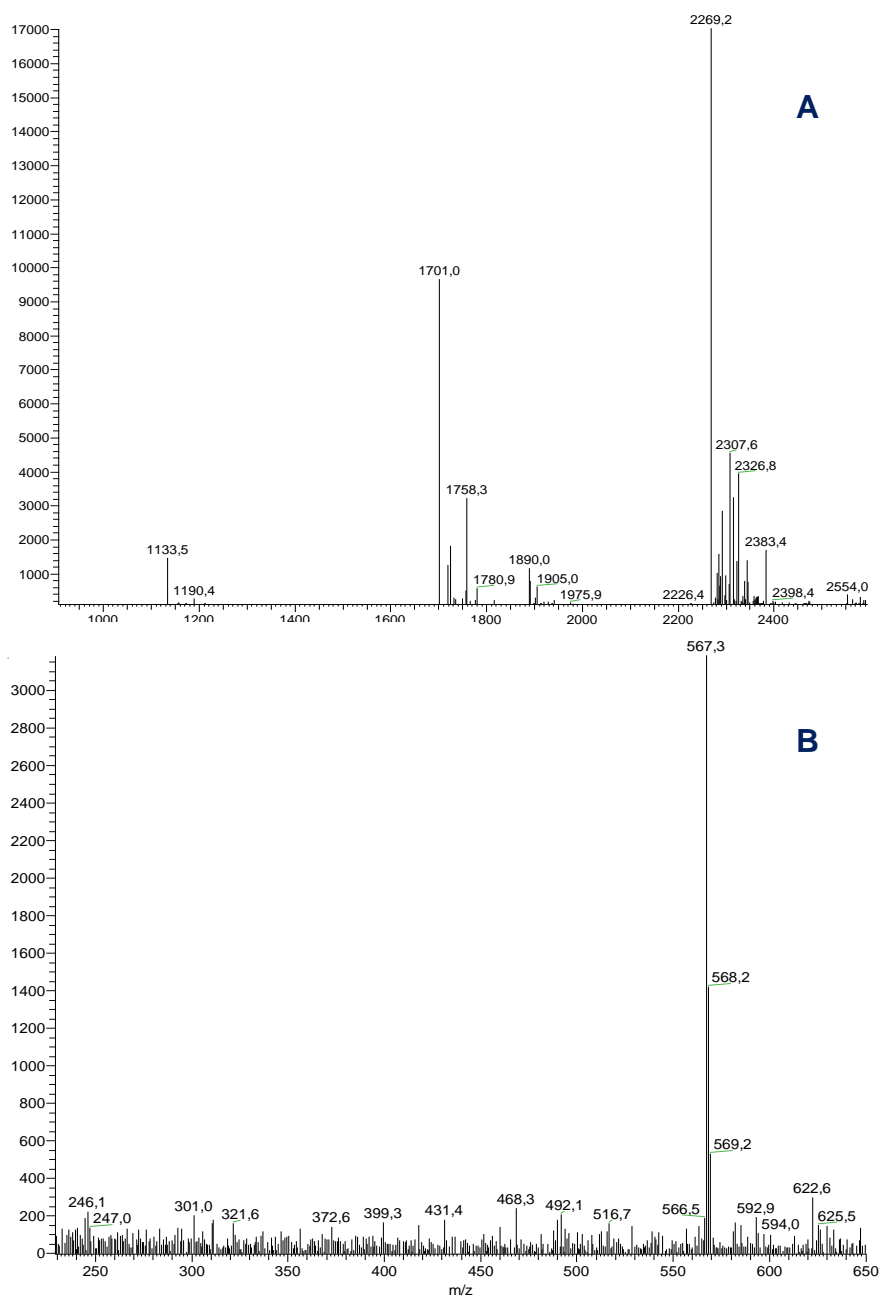


Figura 26.- Espectro de masas de una alícuota de solución acuosa de complejo de inclusión de luteína **(A)** y del lisado procedente de una preparación de VMBC que fue previamente incubada con solución acuosa de complejo de inclusión de luteína y separada de esa solución después de la incubación por centrifugación **(B)**. En la **figura A** destacan dos iones claramente, un pico a una relación $m/z = 1701$ que se corresponde a la forma del ión desprotonado del complejo de inclusión con una molécula de luteína $[\beta\text{-CD} + \text{luteína} - \text{H}]^-$ y el segundo pico a una relación $m/z = 2269$ que podría corresponderse con el ión del complejo $\beta\text{-CD}$ incluyendo dos moléculas de luteína $[\beta\text{-CD} + 2 \times \text{luteína} - \text{H}]^-$. En la **figura B** el pico principal aparece a una relación $m/z = 567$ que se corresponde a la forma desprotonada del ión de luteína $[\text{luteína} - \text{H}]^-$.

El efecto que sí se aprecia es el que produce un incremento de la concentración inicial de complejo de inclusión en la solución donante en la eficiencia de la absorción. A la menor concentración (0,5 μM), la eficiencia de la absorción desde la suspensión Tween carotenoide es significativamente superior a la alcanzada con los correspondientes complejos de inclusión, salvo en el caso de luteína ($p < 0,01$), como se aprecia en la Figura 24. En el siguiente nivel de concentración (1 μM) todavía se aprecia un comportamiento heterogéneo. Así, la eficiencia de la asimilación desde la suspensión Tween sigue siendo superior en el caso de β -caroteno manteniendo la tendencia observada a la concentración inferior ($p < 0,01$). Para luteína, no se aprecian diferencias significativas en uno y otro valor ($p = 0,845$). Sin embargo, esta tendencia sí se invierte en el caso de licopeno para el que la eficiencia de asimilación es significativamente superior cuando ésta se realiza desde la solución de complejos de inclusión ($p < 0,01$). Finalmente, y a la concentración 2,5 μM se consigue una mayor eficiencia de absorción cuando la asimilación se realiza desde la solución de complejos de inclusión carotenoide, independientemente de su naturaleza (caroteno o xantofila). Los incrementos de la cantidad absorbida son del 50,6%, 185% y 128% para β -caroteno, luteína y licopeno, respectivamente.

La particularidad del equilibrio entre el estado complejado y las correspondientes formas libres es que *a priori* sólo es posible alcanzar una concentración máxima en equilibrio de compuesto guest (en este caso carotenoide) igual a su solubilidad. Con esta condición, para las concentraciones de 0,5 μM y 1 μM el proceso de disociación no alcanza un óptimo favorable por lo que se observa, de forma general, cómo los complejos de inclusión presentan una eficiencia de asimilación inferior a la alcanzada con las suspensiones Tween. A la concentración superior, el equilibrio de disociación estará desplazado hacia las formas libres incrementando la concentración de compuesto guest disponible para su asimilación. Incluso es posible que la concentración de compuesto libre llegue a superar el máximo fijado por su solubilidad (Bekers y colaboradores, 1991; Szejtli, 1994) lo que incrementa aún más la eficiencia del transporte. Este doble efecto es el que explica los significativos incrementos

observados cuando se utiliza la concentración más alta en la solución donante de complejos de inclusión carotenoide.

En la Figura 27 se representa la cantidad carotenoide, expresada en pmol/mg proteína, incorporada a la membrana plasmática de VMBC después de 20 minutos de incubación a 37 °C para β -caroteno, luteína y licopeno, desde la suspensión Tween o desde la solución acuosa de complejos de inclusión, en función de la concentración inicial carotenoide (0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M), cuando la preparación de VMBC se incubó previamente con una solución de lipoproteínas de alta densidad.

Cuando la solución donante está compuesta por suspensión Tween de carotenoide y en presencia de inhibidor se observa un descenso significativo de la cantidad asimilada si se comparan los datos con aquellos obtenidos en las mismas condiciones de concentración y tipo de carotenoide en suspensión Tween pero sin inhibidor. La eficiencia de la asimilación sigue siendo superior para los carotenos respecto a la xantofila luteína. Es precisamente en el caso de luteína donde se aprecia el nivel de descenso más acusado (70% de descenso en presencia de inhibidor, para los tres niveles de concentración). Al igual que en los ensayos realizados en ausencia de inhibición se aprecia un ajuste curvilíneo para la asimilación de β -caroteno y luteína (al igual que en la Figura 25) y lineal en el caso de licopeno. En la Tabla 17 se exponen los efectos lineales ($p < 0,05$) de los factores sobre la respuesta considerada (asimilación carotenoide). Para β -caroteno y licopeno, los coeficientes son positivos, mientras que para luteína el coeficiente es negativo. Este hecho indica que en la asimilación de carotenos están implicados diferentes receptores a los empleados para la xantofila luteína. En cualquier caso la presencia de inhibidor no logra bloquear completamente el proceso de asimilación carotenoide, ya que los descensos nunca llegan al 100%, lo que apoya la co-existencia de los dos mecanismos de asimilación, difusión facilitada y difusión simple, que no necesita de la actividad de proteínas transportadoras, y por tanto no se afecta por la presencia de inhibidores de dicha actividad. También es cierto que con el tipo y cantidad de inhibidor utilizado para este ensayo se obtenga una capacidad de inhibición inferior, sin llegar a bloquear completamente todo el

transporte en comparación con otros inhibidores y/o cantidades (Boffelli y colaboradores, 1997).

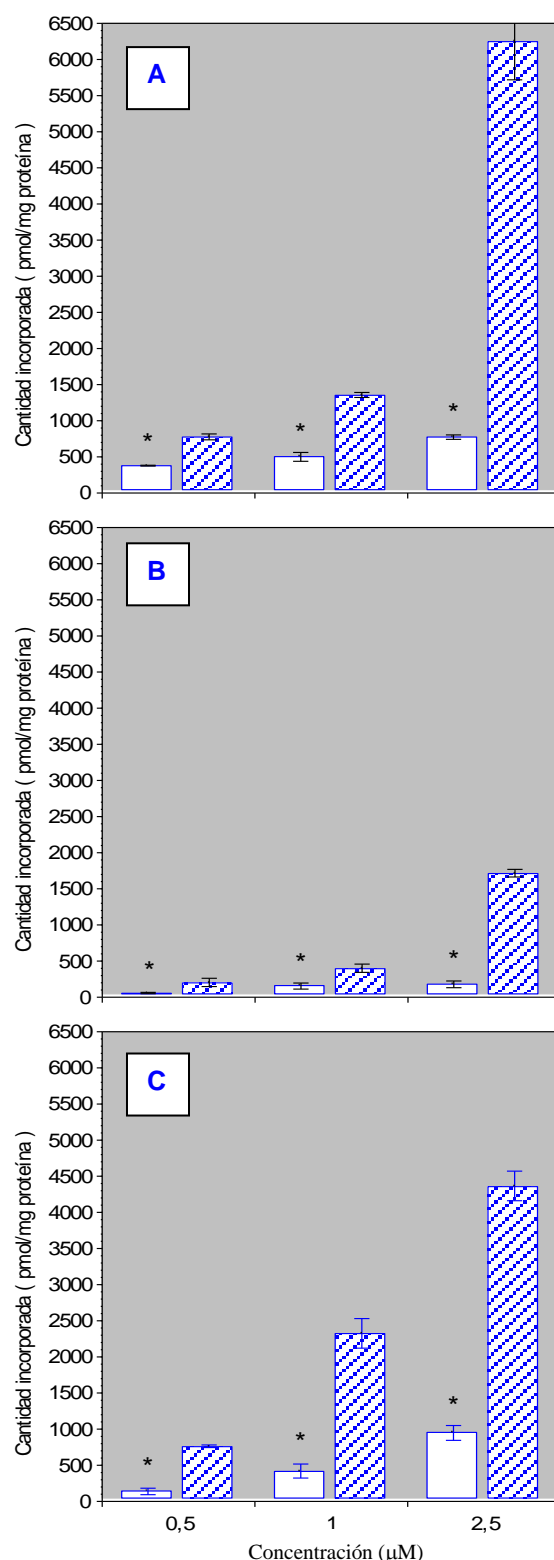


Figura 27.- Representación de la cantidad carotenoide expresada en pmol/mg proteína incorporada a la membrana plasmática de VMBC después de 20 minutos de incubación a 37 °C para β-caroteno (**A**), luteína (**B**) y licopeno (**C**), desde la suspensión Tween (barras blancas) o desde la solución acuosa de complejo de inclusión β-ciclodextrina/carotenoide (barras azules), en función de la concentración inicial carotenoide (0,5 μM, 1 μM, 2,5 μM) cuando la preparación de VMBC se incubó previamente con una solución de lipoproteínas de alta densidad. Los valores de asimilación obtenidos se representan como valores medios ± SD (n=3); diferencias significativas en los niveles de asimilación alcanzados para los dos tipos de soluciones donadoras, para cada pigmento, y para cada concentración ($p < 0,01$, test Duncan) se indican mediante un asterisco.

Diversos estudios han utilizado las HDL como eficientes inhibidoras del transporte de colesterol y otros lípidos, concretando como mecanismo de inhibición el enlace específico de la lipoproteína al receptor, que queda bloqueado para realizar el transporte de lípidos procedentes de otras partículas donantes (Schulthess y colaboradores, 2000; Werder y colaboradores, 2001). Con el presente estudio también queda demostrado que las HDL son efectivas en la inhibición de carotenoides. Este hecho tiene varias repercusiones fisiológicas. La primera de ellas a destacar, es la contribución de las células del epitelio intestinal como fuente de lipoproteínas/apoproteínas (Boffelli y colaboradores, 1997) capaces de limitar el transporte de compuestos lipídicos como los carotenoides, circunstancia que se generalizaría a toda la población. Las diferencias particulares estarían en la capacidad de cada individuo de regular la síntesis y función de los receptores implicados en la asimilación de lípidos. Así, las diferencias genéticas o el control de la expresión de los receptores implicados en el transporte lipídico darían explicación al fenómeno de los no respondedores observado en los estudios *in vivo* de asimilación de carotenoides en los que, para esos grupos de individuos no se aprecia un incremento significativo de la presencia en plasma de alguno de los carotenoides ingeridos (Johnson y Russell, 1992; Stahl y colaboradores, 1995; Borel y colaboradores, 1998; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2005). Otra situación distinta a las anteriores, pero que también afectará a la eficiencia de la asimilación, se produce durante procesos inflamatorios que afectan al epitelio intestinal como la enfermedad inflamatoria intestinal. En los pacientes afectados por el proceso inflamatorio los niveles de vitaminas en plasma son significativamente inferiores a los detectados en individuos sanos (Wendland y colaboradores, 2001). Además de considerar que los pacientes estén estresados oxidativamente y que el desgaste de los antioxidantes sea superior debido a esa condición, también se debería tener en cuenta si el proceso inflamatorio afecta al funcionamiento de los receptores implicados en el transporte de lípidos antioxidantes.

Precisamente, la formulación carotenoide como complejos de inclusión se ha empleado en el presente estudio, no sólo para comprobar su efecto en la eficiencia de la asimilación carotenoide en situación de transporte no bloqueado sino también cuando se limita intencionadamente la capacidad de asimilación de los transportadores implicados en dicho

proceso. Y los resultados son bastante llamativos. Es en situación de inhibición cuando la asimilación de carotenoides desde complejos de inclusión alcanza su máxima eficiencia. Los datos representados en la Figura 27 así lo indican. Si se compara la eficiencia de la asimilación en presencia o ausencia de inhibidor, cuando la solución donante está compuesta por complejos de inclusión carotenoide, se aprecian incrementos significativos en presencia de inhibidor para todas las concentraciones en los casos de β -caroteno y licopeno. Por ejemplo a la concentración de 1 μ M se obtienen incrementos del 85,6% y del 165% para β -caroteno y licopeno, respectivamente. Con la solución donante compuesta por complejos de inclusión de luteína, sólo a la concentración más elevada se obtiene un incremento (aunque no significativo) en situación de inhibición del transporte respecto a la ausencia del mismo.

Salvo para la excepción comentada de complejos de inclusión de luteína se aprecia una mejora de la eficiencia de la asimilación, en presencia de inhibidor del transporte, hecho, francamente, no esperado en el planteamiento del estudio. En este caso la interacción entre el complejo de inclusión y los componentes de las lipoproteínas de alta densidad, utilizadas como inhibidores del transporte, tiene un efecto beneficioso en la eficiencia de asimilación. Se ha demostrado que diversos compuestos lipídicos y proteícos, compiten con fármacos por su inclusión en la cavidad de la ciclodextrina, e incluso llegan a liberar al compuesto guest ya complejoado, asociándose preferentemente aquellos con la ciclodextrina. Tokumura y colaboradores (1986) utilizaron esta competitividad como estrategia para incrementar la bioaccesibilidad de un fármaco complejoado con β -ciclodextrina. Al incorporar fenilalanina, como agente competidor, en la solución donante del complejo de inclusión se produjo un incremento en la bioaccesibilidad del fármaco. En el presente estudio, el intercambio se producirá entre compuestos lipídicos de las lipoproteínas y el complejo de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide, más probablemente con colesterol con el que β -ciclodextrina presenta una excelente asociación (Nakanishi y colaboradores, 1992). El efecto inhibidor de las HDL procedentes de las células del epitelio intestinal en la asimilación de carotenoides, como se ha comentado anteriormente, tendría para los complejos de inclusión β -ciclodextrina:carotenoide un efecto sinérgico en la asimilación.

El diseño experimental de estudios *in vivo* que permita comprobar la eficiencia de la formulación β -ciclodextrina:carotenoide con la co-ingestión de compuestos competitivos por la complejación, será de utilidad con un especial interés cuando se trate de individuos en condiciones de transporte deficiente por alguna situación patofisiológica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Primera. La aplicación de un procedimiento de digestión *in vitro* junto con la separación de la fracción micelar por ultracentrifugación, representa una herramienta analítica completa con la que se puede establecer la significación y alcance de diversos factores en la eficiencia de la digestibilidad de carotenoides y analizar en detalle la influencia de la composición de la matriz alimentaria en el proceso digestivo.

Segunda. Las diferencias físico-químicas de los carotenoides (consecuencia de sus características estructurales), originan la necesidad de un entorno lipofílico distinto para facilitar la emulsión de estos pigmentos y su posterior incorporación micelar. La modificación en la composición de la matriz lipofílica causa cambios cualitativos y cuantitativos en la eficiencia de micelarización, en función de la clase de pigmentos, destacando la interacción entre *colesterol* y *presencia de aceite* como los factores que modifican sustancialmente las características lipofílicas del medio donde tiene lugar la micelarización de carotenoides y su efectividad.

Tercera. Las matrices lipofílicas si bien son necesarias para asegurar la eficiencia de la micelarización y posterior captación de compuestos lipofílicos bioactivos como los carotenoides, no son las más adecuadas para maximizar la eficiencia de micelarización. La transferencia de estos compuestos lipofílicos a una matriz hidrofílica mediante la participación de emulgentes que dispersan finamente el contenido lipídico, sí constituye una estrategia adecuada para incrementar su digestibilidad.

Cuarta. En el diseño de nuevas formulaciones alimentarias, el concepto de bioaccesibilidad debe formar parte de los criterios de discriminación y selección de ingredientes que optimizan las cualidades de esas formulaciones. Los modelos de digestión *in vitro* constituyen entonces el soporte analítico con el que estimar la digestibilidad del compuesto bioactivo desde diferentes matrices y son punto de partida para posteriormente analizar la asimilación sin recurrir a modelos de experimentación *in vivo*.

Quinta. El desarrollo de modelos de absorción *in vitro*, como vesículas de membrana de borde en cepillo o cultivos celulares, han permitido recomponer sustancialmente la teoría sobre el mecanismo de absorción de colesterol, carotenoides y otros compuestos lipídicos, observándose las características de una difusión facilitada. Constituyen por tanto una herramienta analítica con la que estimar la asimilación de compuestos bioactivos (los carotenoides) y determinar el perfil biocinético de lípidos en general, y de los carotenoides en particular.

Sexta. El estudio de asimilación *in vitro* viene a completar el diseño de alimentos en los que el término bioaccesibilidad no sólo es un atributo de calidad, sino también un parámetro necesario que forma parte del concepto de alimento funcional.

Séptima. Al aplicar un modelo de absorción *in vitro* en el estudio de la asimilación de carotenoides se observa como las apolipoproteínas de alta densidad (HDLs) son eficientes inhibidoras del transporte de carotenoides. La eficiencia de la asimilación es superior para los carotenos respecto a la xantofila luteína. En la asimilación de carotenos están implicados diferentes receptores a los empleados para la xantofila luteína. Si se modifica el entorno molecular de los carotenoides mediante su integración en complejos de inclusión con β -ciclodextrina se modifica sustancialmente el proceso de inhibición del transporte alcanzándose la máxima eficiencia de asimilación de estos pigmentos.

Octava. El diseño experimental de estudios *in vivo* que permita comprobar la eficiencia de la formulación β -ciclodextrina:carotenoide con la co-ingestión de compuestos competitivos por la complejación, será de utilidad con un especial interés cuando se trate de individuos en condiciones de transporte deficiente por alguna situación patofisiológica (baja densidad de transportadores residuales, inflamación intestinal crónica, un estatus oxidativo del epitelio que modifique la necesidad de incorporar antioxidantes liposolubles, etc).

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora María Isabel Mínguez Mosquera, directora del Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos, que me ofreció la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo para recibir la formación adecuada en la carrera investigadora.

A los doctores D. Antonio Pérez Gálvez y D. Juan Garrido Fernández por dirigir este trabajo con tanto entusiasmo y entrega. Gracias por vuestro apoyo desde el principio y por enseñarme todo lo que sé de pigmentos.

A la doctora Dña. Isabel Vicario Romero por su labor como tutora de este trabajo.

A mis compañeros del Grupo de Química y Bioquímica de pigmentos, por ayudarme siempre que lo he necesitado (y en especial a mi compañera Irene por estar ahí siempre).

A los doctores D. José J. Ríos y D. Francisco Rincón, por su contribuciones a las distintas experiencias realizadas en esta tesis.

Al Dr. Rafael Guillén Bejarano, Jefe del Departamento de Biotecnología de Alimentos y a la Dirección del Instituto de la Grasa, por su labor como responsables y gestores de la investigación del centro.

Al programa I3P (actualmente JAE) y a los proyectos de investigación AGR-03025 y AGL2007-61146/ALI que apoyan económicamente la experimentación.

A todos mis compañeros del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa, gracias por vuestros consejos, por vuestro apoyo y por los buenos momentos que pasamos juntos (especialmente a Javi y a Belén, por acordarse de mí cuando he estado lejos).

A mis padres, por estar siempre a mi lado.

A mis seres queridos que ya no están pero que siempre estarán ahí.

Y en especial, a la persona que comparte su vida conmigo.

Muchas gracias a todos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA**A**

Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, Cummings JH, Howlett J, Müller DJG, Persin C, Pijls LTJ, Rechkemmer G, Tuijelaars S, Verhagen H. Passclaim: consensus on criteria. *European Journal of Nutrition*, 2005, 44(suppl.1), i5-i30.

Aguilar M, Rincón F. Improving knowledge of garlic paste greening through the design of an experimental strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 10266-10274.

Alcorn CJ, Simpson RJ, Leahy D, Peters TJ. In vitro studies of intestinal drug absorption. *Biochemical Pharmacology*, 1991, 42, 2259-2264.

Alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*, 1994, 330, 1029-1035.

Altmann SW, Davis H, Yao X, Lavery M, Compton DS, Zhu LJ, Crona JH, Caplen MA, Hoos LM, Tetzloff G, Priestley T, Burnett DA, Strader CD, Graziano MP. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1580, 77-93.

Aman R, Bayha S, Carle R, Schieber A. Determination of carotenoid stereoisomers in commercial dietary supplements by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 6086-6090.

Amar I, Aserin A, Garti N. Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 4775-4781.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 1983, 221, 1256-1264.

Avdeef A, Nielsen PE, Tsinman O. PAMPA – a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 22, 365-374.

B

Bach TJ. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. Review. *Lipids*, 1995, 30, 191-202.

Baker R, Günther C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, 15, 484-488.

Bartosz G, Janaszewska A, Ertel D, Bartosz M. Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, 46, 519-528.

Bauernfeind JC. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1972, 20, 456-473.

Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, Buit A, Underberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1991, 17, 1503–1549.

Beutner S, Frixel S, Ernst H, Hoffmann T, Hernandez-Blanco I, Hundsdoerfer C, Kiesendahl N, Kock S, Martin HD, Mayer B, Noack P, Pérez-Gálvez A, Kock G, Scherrers R, Schrader W, Sell S, Stahl W. Carotenylflavonoids, a novel group of potent, dual-functional antioxidants. *Archives of Organic Chemistry*, 2007, 7, 279-295.

Bleasby K, Chauhan S, Brown C. Characterization of MPP + secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: Role of P-glycoprotein and a novel Na(+)-dependent organic cation transport mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 92, 1250-1261.

Boffelli D, Compassi S, Werder M, Weber FE, Phillips MC, Schulthess G, Hauser H. The uptake of cholesterol at the small-intestinal brush border membrane is inhibited by apolipoproteins. *FEBS Letters*, 1997, 411, 7-11.

Boileau TWM, Moore AC, Erdman JW. Carotenoids and vitamin A. En: Antioxidant status, diet, nutrition, and health, páginas: 133-151. Ed.: Pappas AM. CRC, Florida (EEUU), 1999.

Borel P, Tyssandier V, Mekki N, Grolier P, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V. Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128, 1361-1367.

Borgström B, Erlanson-Alvertsson C. Pancreatic colipase. En: Lipases, páginas: 151-183. Eds.: Borgström B, Brockman HL. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (Holanda), 1984.

Bowen PE, Herbst-Espinosa SM, Hussain EA, Stacewicz-Sapuntzakis M. Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. The Journal of Nutrition, 2002, 132, 3668-3673.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 1995, 28, 25-30.

Breithaupt DE, Bamedi A, Wirt U. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002b, 132, 721-728.

Breithaupt DE, Schwack W. Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. European Food Research and Technology, 2000, 211, 52-55.

Breithaupt DE, Wirt U, Bamedi A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002a, 50, 66-70.

Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. Review. The FASEB Journal, 1995, 9, 1551-1558.

Britton G. Overview of carotenoids biosynthesis. En: Carotenoids, volumen 3, páginas: 13-147. Eds.: Britton G, Liaaen J, Pfander H. Birkhäuser, Basel (Suiza), 1998.

Brown ED, Blakely SR, Babu U, Grundel E, Mitchell GV. Vegetable concentrates interact with canthaxanthin to affect carotenoid bioavailability and superoxide dismutase activity but not immune response in rats. Nutrition Research, 1997, 17, 989-998.

Burckhardt G, Kramer W, Kurz G, Wilson FA. Inhibition of bile salt transport in brush-border membrane vesicles from rat small intestine by photoaffinity labeling. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258, 3618-3622.

Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. Annual Review of Nutrition, 1992, 12, 139-159.

C

Carriere V, Lesuffleur T, Barbat A, Rousset M, Dussaulx E, Costet P, de Waziers I, Beaune P, Zweibaum A. Expression of cytochrome P-450 3A in HT29-MTX and Caco-2 clone TC7. *FEBS Letters*, 1994, 355, 247-250.

Carter CP, Howles PN, Hui DY. Genetic variation in cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127, 1344-1348.

Castenmiller JJM, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18, 19-38.

Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 1985, 227, 375-381.

Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressen JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86, 269-282.

Chitchumroonchokchai Ch, Failla M. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of xanthophylls by Caco-2 human intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136, 588-594.

Colgan HA, Floyd S, Noone EJ, Gibney MJ, Roche HM. Increased intake of fruit and vegetables and a low-fat diet, with and without low-fat plant sterol-enriched spread consumption: effects on plasma lipoprotein and carotenoid metabolism. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2004, 17, 561-569.

Compassi S, Werder M, Boffelli D, Weber FE, Hauser H, Schultess G. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*, 1995, 34, 16473-16482.

Compassi S, Werder M, Weber FE, Boffelli D, Hauser H, Schultess G. Comparison of cholesterol and sitosterol uptake in different brush border membrane models. *Biochemistry*, 1997, 36, 6643-6652.

Cooper DA, Webb DR, Peters JC. Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(suppl.8), 1699S-1709S.

Cornell, JA. The original mixture problem: designs and models for exploring the entire simplex factor space. En: Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data, páginas: 22-95. John Wiley & Sons, Inc. New York (EEUU), 2002a.

Cornell, JA. The analysis of mixture data. En: Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data, páginas: 223-285. John Wiley & Sons, Inc. New York (EEUU), 2002b.

Cunningham FX, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49, 557-583.

D

Dahlqvist A. Method for assay of intestinal disaccharidases. Analytical Biochemistry, 1964, 7, 18-25.

Davies, BH. Carotenoids. En: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, volumen 2, capítulo 19. Ed.: Goodwin TW. Academic Press, Londres (Inglaterra), 1976.

Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1997, 14, 221-286.

De Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2003, 14, 362-369.

Deming DM, Erdman JW. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. Pure and Applied Chemistry, 1999, 71, 2213-2223.

Directiva 95/45/CE de 26 de Julio de 1995 por la que se establece criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios. Diario Oficial L 226, 22/09/1995, 1-45.

During A, Algaugh G, Smith JC. Characterization of β -carotene 15-15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 249, 467-474.

During A, Dawson HD, Harrison EH. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *The Journal of Nutrition*, 2005, 135, 2305-2312.

During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *Journal of Lipid Research*, 2002, 43, 1086-1095.

E

Ekanayake A, Nelson PE. An in vitro method for estimating biologically available vitamin B6 in processed foods. *The British Journal of Nutrition*, 1986, 55, 235-244.

El-Gorab MI, Underwood BA, Loerch JD. The roles of bile salts in the uptake of beta-carotene and retinol by rat everted gut sacs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, 401, 265-277.

El-Kamel AH, Al-Fagih IM, Alsarra IA. Testosterone solid lipid microparticles for transdermal drug delivery. Formulation and physicochemical characterization. *Journal of Microencapsulation*, 2007, 24, 457-475.

Erdman JW, Fahey GC, White CB. Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. *The Journal of Nutrition*, 1986, 116, 2415-2423.

Everett SA, Dennis F, Patel KB, Maddix S, Kundu SC, Willson RL. Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 3988-3994.

F

Fanun M. Phase behaviour, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 2008, 139, 14-22.

FAO/WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Ed.: SNP Best-set Typesetter Ltd. Hong Kong (China), 1998.

Fernández-García E, Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Changes in Composition of the Lipid Matrix Produce a Differential Incorporation of Carotenoids in Micelles. Interaction Effect of Cholesterol and Oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007, 8, 379-384.

Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, 90, 6233-6235.

Fotouhi N, Meydani M, Santos MS, Meydani SN, Hennekens CH, Gaziano JM. Carotenoids and tocopherol concentrations in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and red blood cells after long-term β -carotene supplementation in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996, 63, 553-558.

Fouad MF, Farrell PG, Marshall WD, van de Voort FR. In vitro model for lipase-catalyzed lipophile release from fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39, 150-153.

Fuller CJ, Faulkner H, Bendich A, Parker RS, Roe DA. Effect of β -carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 56, 684-690.

Fung TT, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hu FB. Dietary patterns and the risk of coronary heart disease in women. *Archives of Internal Medicine*, 2001, 161, 1857-1862.

G

Gallo LL, Newbill T, Hyun J, Vahouny GV, Treadwell CR. Role of pancreatic cholesterol esterase in the uptake and esterification of cholesterol by isolated intestinal cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1977, 156, 277-281.

Garret DA, Failla ML, Sarama RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 4301-4309.

Garti N, Spornath A, Yaghmur A, Aserin A, Hoffman RE. Food-grade microemulsions based on nonionic emulsifiers: media to enhance lycopene solubilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 6917-6922.

Garti N, Yaghmur A, Leser ME, Clement V, Watzke HJ. Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 2552-2562.

Gartner C, Stahl W, Sies H. Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to b-carotene in the human. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1996, 66, 119-125.

Gartner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 66, 116-122.

Goodwin TW. Plants. En: *The biochemistry of the carotenoids*, páginas: 153-155. Ed.: Goodwin TW. Chapman and Hall, Londres (Inglaterra), 1980.

Goodwin TW. Distribution of carotenoids. En: *Carotenoids. Methods in Enzymology*, volumen 213, páginas: 167-172. Ed.: Packer L. Academic Press, San Diego (EEUU), 1992.

Goodwin TW, Britton G. Distribution and analysis of carotenoids. En: *Plant pigments*, páginas: 61-132. Ed.: Goodwin TW. Academic Press, San Diego (EEUU), 1988.

Gramenzi A, Gentile A, Fasoli M, Negri E, Parazzini F, La Vecchia C. Association between certain foods and risk of acute myocardial infarction in women. *British Medical Journal*, 1990, 300, 771-773.

Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Blázquez-García S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2007, 102, 641-648.

Gross J. En: *Pigments in fruits*, páginas: 126-162. Ed.: Schweigert BS. Academic Press, Londres (Inglaterra), 1987.

Guo R, Yang J, Friberg SE, Landeryou V, Hall L. Polyglyceryl oleate surfactants and the stratum corneum lipid. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2000, 21, 1-18.

H

Halevy O, Sklan D. Inhibition of arachidonic acid oxidation by beta-carotene, retinol and alpha-tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 918, 304-307.

Handelman GJ, Dratz EA, Collin RC, Van Kuijk FJ. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1988, 29, 850-855.

Handelman GK, Snodderly DM, Adler AJ, Russett MD, Oratz EA. Measurements of carotenoids in human and monkey retinas. En: *Methods in epidemiology*, páginas: 220-230. Ed.: Packer L. Academic Press, San Diego (EEUU), 1992.

Harrison EH. Lipases and carboxylesterases: possible roles in the hepatic metabolism of retinol. *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18, 259-276.

Hauser H, Howell K, Dawson RMC, Bowyer DE. Rabbit small intestinal brush border membrane preparation and lipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, 602, 567-577.

Health Canada. Canada's Food Guide to Healthy Eating. Minister of Public Works and Government Services Canada, 1997.

Hedrén E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 56, 425-430.

Heinemann T, Kullak-Ublick GA, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1991, 40, S59-S63.

Henderson CT, Mobarhan S, Bowen P, Stacewicz-Sapuntzakis M, Langenberg P, Kiani R, Lucchesi D, Sugerman S. Normal serum response to oral β -carotene in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 1989, 8, 625-635.

Henry BS. Natural food colours. En: *Natural food colorants*, páginas: 40-79. Eds.: Hendry GAF y Houghton JD. Blackie Academic and Professional, Londres (Inglaterra), 1996.

Hernell O, Staggars JE, Carey MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary during intestinal digestion and absorption: phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry*, 1990, 29, 2041-2056.

Herraiz LA, Hsieh WC, Parker RS, Swanson JE, Bendich A, Roe DA. Effect of UV exposure and betacarotene supplementation on delayed-type hypersensitivity response in healthy older men. *Journal of the American College of Nutrition*, 1998, 17, 617-624.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 1993, 342, 1007-1011.

Hirayama F, Uekama K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 36, 125-141.

Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Häkkinen S, Albanes D, Virtamo J. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology*, 2001, 12, 62-67.

Holden JM, Eldridge AL, Beecher GR, Buzzard IM, Bhagwat S, Davis CS, Douglass LW, Gebhardt S, Haytowitz D, Schakel S. Carotenoid content of U.S. foods, an update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1999, 12, 169-196.

Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Dietary carotenoids, serum beta-carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 2002, 156, 536-547.

Hollander D, Ruble PE. Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *The American Journal of Physiology*, 1978, 235, E686-E691.

Hopfer U, Nelson K, Perrotto F, Isselbacher KJ. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248, 25-32.

Hughes DA, Wright AJA, Finglas PM, Polley AC, Bailey AL, Astley SB, Southon S. Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface

molecules on blood monocytes from healthy male non-smokers. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 182(suppl.1), S11-S15.

Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 2002, 43, 2017-2030.

Huo T, Ferruzzi MG, Schwartz SJ, Failla ML. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 8950-8957.

I

Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal of Lipid Research*, 1988, 29, 1573-1582.

Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2003, 92, 1545-1558.

J

Jalal F, Nesheim MC, Agus Z, Sanjur D, Habicht JP. Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of b-carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 68, 623-629.

James WP, Avenell A, Broom J, Whitehead J. A one-year trial to assess the value of orlistat in the management of obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 1997, 21(suppl.3), S24-S30.

Jayarajan P, Reddy V, Mohanran M. Effect of dietary fat on absorption of beta carotene from green leafy vegetables in children. *The Indian Journal of Medical Research*, 1980, 71, 53-56.

Johnson EJ, Russell RM. Distribution of orally administered beta-carotene among lipoproteins in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 56, 128-135.

Johnston CS, Taylor CA, Hampl JS. More americans are eating "5 a day" but intakes of dark green and cruciferous vegetables remain low. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130, 3063-3067.

Jones PJ, Ntanios F. Comparable efficacy of hydrogenated versus nonhydrogenated plant sterol esters on circulating cholesterol levels in humans. *Nutrition Reviews*, 1998, 56, 245-248.

Joshi KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 2001, 134, 1106-1114.

Jumarie C, Malo C. Caco-2 cells cultured in serum free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of cellular physiology*, 1991, 149, 24-33.

K

Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high-throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, 41, 1007-1010.

Keelan M, Burdick S, Wirzba B, Thomson ABR. Characterization of lipid uptake into rat jejunal brush border membrane vesicles. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1992, 70, 1128-1133.

Kensler TW, Taffe BG. Free radicals in tumor promotion. *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 1986, 2, 347-387.

Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Müller M, Semenza G. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, 506, 136-154.

Key TJ, Thorogood M, Appleby PN, Burr ML. Dietary habits and mortality in 11,000 vegetarians and health conscious people: results of a 17 year follow up. *British Medical Journal*, 1996, 313, 775-779.

Khachik F, Beecher GR. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. I. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36, 929-937.

Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63, 71-80.

Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in extracts of human plasma. *Analytical Chemistry*, 1992, 64, 2111-2122.

Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, von Lintig J. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2002, 99, 10581-10586.

Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *American Journal of Epidemiology*, 1994, 139, 1180-1189.

Korhonen H. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 2002, 55, 79-88.

Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 1994, 66, 1003-1010.

Krinsky NI, Cornwell DG, Oncley JL. The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1958, 73, 233-246.

L

Lachance PA. Nutrient addition to foods: the public health impact in countries with rapidly westernizing diets. En: *Preventive Nutrition: the comprehensive guide for health professionals*, páginas: 441-454. Eds.: Bendich A, Deckelbaum RJ. Humana Press, Totowa (EEUU), 1997.

Lancrajan I, Diehl HA, Socaciu C, Engelke M, Zom-Kruppa M. Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and β -cyclodextrins. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2001, 112, 1-10.

Law MR, Morris JK. By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease?. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 52, 549-556.

Lechene De la Porte P, Aboukail N, Lafont H, Lombardo D. Subcellular localization of cholesterol ester hydrolase in the human intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 920, 237-246.

Lehner R, Verger R. Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. *Biochemistry*, 1997, 36, 1861-1868.

Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *Journal of Hepatology*, 1995, 23, 550-556.

Liebler DC. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 669, 20-31.

Ling K, Lee H, Hollander D. Mechanisms of linoleic acid uptake by rabbit small intestinal brush border membrane vesicles. *Lipids*, 1989, 24, 51-55.

Liu J, Ledoux DR, Veum TL. In vitro prediction of phosphorous availability in feed ingredients for swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 2678-2681.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. Review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, 560, 1-65.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85, 1017-1025.

M

Malone WF. Studies evaluating antioxidants and beta-carotene as chemopreventives. Review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53(suppl.1), 305S-313S.

Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 2004, 38, 771-785.

Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables, and selected multicomponent foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 1993, 93, 318-323.

Manzocco L, Nicoli MC. Food design: from the methodological approach to the case study of low-calorie syrups. *Trends in Food Science and Technology*, 2002, 13, 422-429.

Marnett L. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*, 1987, 8, 1365-1373.

Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1033-1046.

Metzler CM, Huang DC. Statistical methods for bioavailability and bioequivalence. *Clinical Research Practices and Drug Regulatory Affairs*, 1983, 1, 109-132.

Mezadri T, Pérez-Gálvez A, Hornero-Méndez D. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *European Food Research and Technology*, 2005, 220, 63-69.

Micozzi MS, Brown ED, Edwards BK, Bieri JG, Taylor PR, Khachik F, Beecher GR, Smith JC. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55, 1120-1125.

Miller D, Crane RK. A procedure for the isolation of the epithelial brush border membrane of hamster small intestine. *Analytical Biochemistry*, 1961, 2, 284-286.

Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, 34, 2248-2256.

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 1996, 383, 240-242.

Mínguez-Mosquera MI. Cuantificación de pigmentos. In *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*; Mínguez-Mosquera, MI., Ed.; Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: Sevilla, 1997; pp 159-162.

Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41, 1616-1620.

Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. Changes in provitamin A during paprika processing. *Journal of Food Protection*, 1997, 60, 853-857.

Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Study of lability and kinetics of the main carotenoid pigments of red pepper in the de-esterification reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 566-569.

Momsen WE, Brockman HL. Inhibition of pancreatic lipase B activity by taurodeoxycholate and its reversal by colipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1976, 251, 384-388.

Moore AC, Gugger ET, Erdman JW. Brush border membrane vesicles from rats and gerbils can be utilized to evaluate the intestinal uptake of all-trans and 9-cis β -carotene. *Journal of Nutrition*, 1996, 126, 2904-2912.

Moussa M, Landrier, JF, Reboul E, Ghiringhelli O, Coméra, C, Collet X, Fröhlich K, Böhm V, Borel P. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *Journal of Nutrition*, 2008, 138, 1432-1436.

Myers RH, Montgomery DC. Response Surface Methodology. En: Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Inc. New York (EEUU), 1995.

N

Nakanishi K, Nadai T, Masada M, Miyajima K. Effect of cyclodextrins on biological membrane. II. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of non-absorbable drug by cyclodextrins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, 40, 1252-1256.

Ngo TT, Lenhoff HM. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry*, 1980, 105, 389-397.

Noakes M, Clifton P, Ntanios F, Shrapnel W, Record I, McInerney J. An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 75, 79-86.

Norata GD, Catapano AL. Lipid lowering activity of drugs affecting cholesterol absorption. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2004, 14, 42-51.

O

O'Neill ME, Thurnham DL. Intestinal absorption of beta-carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. *The British Journal of Nutrition*, 1998, 79, 149-159.

Ohmacht R, Toth G, Voigt G. Separation of serum carotenoids and vitamin A on chromsilamino and-cyano phases by a bidirectional gradient elution technique. *Journal of Chromatography*, 1987, 395, 609-612.

Okamoto H, Sakai T, Danjo K. Effect of sucrose fatty acid esters on transdermal permeation of lidocaine and ketoprofen. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28, 1689-1694.

Olson JA. Vitamin A. En: *Handbook of Vitamins*, páginas: 1-43. Ed.: Machlin LJ. Dekker, New York (EEUU), 1984.

Olson JA. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*, 1994, 66, 1011-1016.

Olson JA. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. Review. *The Journal of Nutrition*, 1996, 126(suppl.4), 1208S-1212S.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, 1996, 334, 1150-1155.

Oomen AG, Tolls J, Sips AJ, Groten JP. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44, 116-124.

Oshima S, Ojima F, Sakamoto H, Ishiguro Y, Terao J. Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127, 1475-1479.

Ottley C. Nutritional effects of new processing technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 2000, 11, 422-425.

P

Paetau I, Chen H, Goh NMY, White WS. Interactions in the postprandial appearance of β -carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 67, 1133-1143.

Paetau I, Khachik F, Brown ED, Beecher GR, Kramer TR, Chittams J, Clevidence BA. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 128, 1187-1195.

Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. Review. *The FASEB Journal*, 1996, 10, 542-551.

Pérez-Gálvez A, Martín HD, Sies H, Stahl W. Incorporation of carotenoids from paprika oleoresin into human chylomicrons. *The British Journal of Nutrition*, 2003, 89, 787-793.

Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1569, 31-34.

Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI. Características químicas, nutricionales y funcionales de los alimentos. *CTC Alimentación*, 2004, 24, 11-20.

Pérez-Gálvez A, Pacheco YM, Bermúdez B, López S, Abia R, Muriana FJG, Villar J, Garrido-Fernández J. Postprandial evolution of the carotenoid content in the TRL fraction after a single ingestion of virgin olive oil in humans. *Food Research International*, 2005, 38, 1097-1102.

Periago MJ, Rincón F, Agüera MD, Ros G. Mixture approach for optimizing lycopene extraction from tomato and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5796-5802.

Peto R, Doll R, Buckely JD, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Review. *Nature*, 1981, 290, 201-208.

Pfander H. Carotenoids: an overview. En: *Carotenoids. Methods in enzymology*, volumen 213, páginas: 3-8. Ed.: Packer L. Academic Press, San Diego (EEUU), 1992.

Pfützner I, Istvan P, Francz PI, Biesalski HK. Carotenoid:methyl- β -cyclodextrin formulations: an improved method for supplementation of cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1474, 163-168.

Poelma FGJ, Tukker JJ. Evaluation of a chronically isolated internal loop in the rat for the study of drug absorption kinetics. *Journal of Pharmacological Sciences*, 1987, 76, 433-436.

Prince MR, Frisoli JK. Beta-carotene accumulation in serum and skin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, 57, 175-181.

Proulx P, McNeil J, Biglez I, Williamson DG. Interaction of lipids with intestinal brush border membrane preparations. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1982, 60, 904-909.

Q

Quilez J, García-Lorda P, Salas-Salvado J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 2003, 22, 343-351.

R

Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85, 1142-1169.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, 1231-1237.

Real Decreto 485/2001, de 4 de Mayo. Lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE, 22/05/2001.

Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, André M, Portugal H, Jourdheuil-Rahmani D, Amiot MJ, Lairon D, Borel P. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochemical Journal*, 2005, 387, 455-461.

Richelle M. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132, 404-408.

Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129, 2170-2176.

Rigtrup KM, McEwen LR, Said HM, Ong DE. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, 60, 111-116.

Rincón F, Martínez B, Delgado JM. Detection of factors influencing nitrite determination in meat. *Meat Science*, 2003, 65, 1421-1427.

Ringer T, DeLoof M, Winterrowd G, Francom S, Gaylor S, Ryan J, Sanders M, Hughes G. Beta-carotene's effects on serum lipoproteins and immunologic indices in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53, 688-694.

Ríos JJ, Fernández-García E, Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, 2008, 106, 1145-1153.

Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 2002, 34, 105-110.

Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 1996, 96, 693-702.

Rock CL, Swendseid ME. Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55, 96-99.

Roels OA, Trout M, Dujacquier R. Carotene balances in boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent. *The Journal of Nutrition*, 1958, 65, 115-127.

Roodenburg AJC, Leenan R, van het Hof KH, Westrate JA, Tijburg LBM. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71, 1187-1193.

Rozner S, Garti N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 282-283, 435-456.

Rudd EA, Brockman HL. Pancreatic carboxyl ester lipase (cholesterol esterase). En: *Lipases*, páginas: 185-204. Eds.: Borgstrom B, Brockman HL. Elsevier Science, New York (EEUU), 1984.

S

Santos MS, Meydani SN, Leka L, Wu D, Fotouhi N, Meydani M, Hennekens CH, Gaziano JM. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996, 64, 772-777.

Sasazuki S. Case-control study of nonfatal myocardial infarction in relation to selected foods in Japanese men and women. *Japanese Circulation Journal*, 2001, 65, 200-206.

Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CA. Absorption of drugs from the rat small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1958, 123, 81-88.

Schmitz HH, Poor CL, Wellman RB, Erdman JW. Concentration of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *The Journal of Nutrition*, 1991, 121, 1613-1621.

Schulthess G, Compassi S, Werder M, Han CH, Phillips MC, Hauser H. Intestinal sterol absorption mediated by scavenger receptor is competitively inhibited by amphipathic peptides and proteins. *Biochemistry*, 2000, 39, 12623-12631.

Singh M, Sharma R, Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 2002, 20, 341–359.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150, 76-85.

Socaciu C, Jessel R, Diehl HA. Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2000, 106, 79-88.

Spernath A, Yagmur A, Aserin A, Hoffman RE, Garti N. Food-grade microemulsions based on nonionic emulsifiers: media to enhance lycopene solubilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 6917-6922.

Spurgeon SL, Turner RV, Harding RW. Biosynthesis of phytoene from isopentenyl pyrophosphate by a neurospora enzyme system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1979, 195, 23-29.

Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *The Journal of Nutrition*, 1992, 122, 2161-2166.

Stahl W, Schwarz W, Laar J, Sies H. All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9 *cis* geometrical isomer. *The Journal of Nutrition*, 1995, 125, 2128-2133.

Stella VJ, Rao VM, Zannou EA, Zia V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 36, 3–16.

Stradi R, Celentano G, Rossi E, Rovati G, Pastore M. Carotenoids in bird plumage. I. The carotenoid pattern in a series of palearctic carduelinae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1995, 110, 131-143.

Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, Terada K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeability assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 228, 181-188.

Szejtli J. Medicinal applications of cyclodextrins. *Medicinal Research Reviews*, 1994, 14, 353–386.

I

Terao J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 1989, 24, 659-661.

Thurnhofer H, Hauser H. Uptake of cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*, 1990, 29, 2142-2148.

Tokumura T, Nanba M, Tsushima Y, Tatsuishi K, Kayano M, Machida Y, Nagai T. Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its β -cyclodextrin complex on oral administration with DL-phenylalanine as a competing agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1986, 75, 391-394.

Tso P. Intestinal lipid absorption. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, volumen 2, páginas: 1867-1908. Eds.: Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH. Raven Press, New York (EEUU), 1994.

Tyssandier V, Lyan B, Borel P. Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 31, 1533, 285-292.

U

Uekama K, Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1987, 3, 1–40.

Ungell AL. Transport studies using intestinal tissue ex vivo. En: *Cell culture models of biological carriers*, páginas 164-188. Ed.: Lehr CM. Taylor and Francis, London (Reino Unido), 2002.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data Laboratory. 2005.

Upritchard JE, Schuurman RWC, Wiersma A, Tijburg LBM, Coolen SAJ, Rijken PJ, Wiseman SA. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces

lipid peroxidation in healthy, non-smoking adult. The American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 78, 985-992.

V

van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC, Hauser H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary b-carotene and cholesterol. Biochemistry, 2005, 44, 4517-4525.

van den Berg H. Carotenoid interactions. Nutrition Reviews, 1999, 57, 1-10.

van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. British Journal of Pharmacology, 2000, 129, 1748-1754.

van het Hof KH, Gartner C, West CE, Tijburg LB. Potential of vegetable processing to increase the delivery of carotenoids to man. International Journal for Vitamin and Nutrition research, 1998, 68, 366-370.

van het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. The Journal of Nutrition, 2000, 130, 503-506.

van Vliet T, Schreurs WHP, van den Berg H. Intestinal beta-carotene absorption and cleavage in men: response of beta-carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dose of beta-carotene. The American Journal of Clinical Nutrition, 1995, 62, 110-116.

von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. The American Journal of Cardiology, 2005, 96, 10D-14D.

Verma RP, Hansch C, Selassie CD. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high-throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. Journal of Computer- Aided Molecular Design, 2007, 21, 3-22.

Verrips CT, Warmoeskerken MMCG, Post JA. General introduction to the importance of genomics in food biotechnology and nutrition. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12, 483-487.

Voorrips LE, Goldbohm RA, Verhoeven DT, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, van den Brandt PA. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Causes and Control*, 2000, 11, 101-115.

W

Wang DQH, Paigen B, Carey MC. Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *Journal of Lipid Research*, 2001, 42, 1820-1830.

Warnick GR, Nguyen T, Albers AA. Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clinical Chemistry*, 1985, 31, 217-222.

WCRF/AICR (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research). Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Banta Book Group, Menasha (EEUU), 1997.

Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart AH, Wolman SI, Baron D, Allard JP. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 74, 259-264.

Werder M, Han CH, Wehrli E, Bimmler D, Schulthess G, Hauser H. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry*, 2001, 40, 11643-11650.

Westrate JA, Meijer GW. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 52, 334-343.

White WS, Peck KM, Bierer TL, Gugger ET, Erdman JW Jr. Interactions of oral β -carotene and canthaxanthin in ferrets. *The Journal of Nutrition*, 1993, 123, 1405-1413.

Wilson G. Cell culture techniques for the study of drug transport. Review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1990, 15, 159-163.

Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 1994, 35, 943-955.

Y

Yaghmur A, Aserin A, Garti N. Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 209, 71-81.

Yamamoto HY, Higashi RM. Violaxanthin de-epoxidase. Lipid composition and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1978, 190, 514-522.

Yong LC, Forman MR, Beecher GR, Graubard BI, Campbell WS, Reichman ME, Taylor PR, Lanza E, Holden JM, Judd JT. Relationship between dietary intake and plasma concentrations of carotenoids in premenopausal women: application of the USDA-NCI carotenoid food-composition database. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, 60, 223-230.

Z

Zechmeister L. Stereoisomeric provitamins A. *Vitamins and hormones*, 1949, 7, 57-81.

Zhi J, Melia AT, Koss-Twardy SG, Arora S, Patel IH. The effect of orlistat, an inhibitor of dietary fat absorption, on the pharmacokinetics of beta-carotene in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 36, 152-159.

Zino S, Skeaff M, Williams S, Mann J. Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants. *British Medical Journal*, 1997, 314, 1787-1791.

Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32, 623-628.